*Postverlagsort Berlin*

# PLANTA

## ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

BEGRÜNDET VON **W. RUHLAND** UND **H. WINKLER**

UNTER MITWIRKUNG VON
**J. BONNER**-PASADENA, **A. ERNST**-ZÜRICH, **H. v. GUTTENBERG**-ROSTOCK,
**R. HARDER**-GÖTTINGEN, **W. SCHUMACHER**-BONN

HERAUSGEGEBEN VON

**L. BRAUNER** MÜNCHEN

**E. BÜNNING** TÜBINGEN

57. BAND, 4. HEFT

MIT 42 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 7. NOVEMBER 1961)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1961

Planta (Berl.)

*Preis DM 23.60*

# Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik

Begründet 1925. Band 1—34 (1945) herausgegeben von *W. Ruhland* und *H. Winkler*. Band 1—21, 1934, als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie", Abteilung E.) Band 35—47. Herausgegeben von *W. Ruhland* und *O. Renner*. Band 48—51. Herausgegeben von *W. Ruhland*, *L. Brauner* und *E. Bünning*


Die Zeitschrift „Planta", Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Die eingereichten Arbeiten sollen 2 Druckbogen (à 16 Druckseiten) in der Regel nicht überschreiten.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 40.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

*Professor Dr. Leo Brauner, München 19, Menzingerstr. 67, Botanisches Institut der Universität,*

oder an

*Professor Dr. Erwin Bünning, Tübingen, Botanisches Institut der Universität, Wilhelmstraße 5.*


**Springer-Verlag**

Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3, Fernsprecher 83 03 01, Fernschreibnummer 01-83 319
Heidelberg 1, Postfach 3027, Fernsprecher 27901, Fernschreibnummer 04-61 723


57. Band **Inhaltsverzeichnis** 4. Heft


Seite

Witsch, H. v., Die Entwicklung männlicher und weiblicher Inflorescenzen bei *Xanthium* unter dem Einfluß von Tageslänge und Gibberellin. Mit 2 Textabbildungen . . . . 357

Ullrich, H., und U. Heber, Ursachen der Frostresistenz bei Winterweizen. IV. Mitteilung. Das Verhalten von Fermenten und Fermentsystemen gegenüber tiefen Temperaturen. Mit 1 Textabbildung . . . . . 370

Klämbt, H.-D., Wachstumsinduktion und Wuchsstoffmetabolismus im Weizenkoleoptilzylinder. IV. Die Identifizierung eines Stoffwechselproduktes der Naphthyl-1-Essigsäure, das möglicherweise Beziehung zur Wachstumsförderung besitzt. Mit 3 Textabbildungen . . . . . 391

Ullrich, W., Zur Sauerstoffabhängigkeit des Transportes in den Siebröhren. Mit 4 Textabbildungen . . . . . 402

Fischer, H., Weitere Untersuchungen über den Gaswechsel von Blütenblättern. Mit 2 Textabbildungen . . . . . 430

Frenzel, B., Modellversuche zur Klärung einiger Probleme der Abgabe von Aminoverbindungen durch die Wurzeln höherer Pflanzen im Boden. Mit 1 Textabbildung . . 444

Milovidov, P., Einige Ergebnisse über den Einfluß von Germanin (Bayer 205) auf die pflanzliche Zelle. Mit 28 Textabbildungen . . . . . 455

Müller, F., Über die natürlichen Indolverbindungen im Blumenkohl. Mit 1 Textabbildung . . . . . 463

Mayr, H. H., und E. Presoly, Zum Nachweis von Chlorcholinchlorid in Pflanzen. Kurze Mitteilung . . . . . 478



Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Planta 57, 357—369 (1961)

Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule München
in Weihenstephan

# DIE ENTWICKLUNG MÄNNLICHER UND WEIBLICHER INFLORESCENZEN BEI *XANTHIUM* UNTER DEM EINFLUSS VON TAGESLÄNGE UND GIBBERELLIN

Von
H. VON WITSCH

Mit 2 Textabbildungen

*(Eingegangen am 13. Juli 1961)*

An Kulturen einer weitgehend tagneutralen Rasse von *Xanthium*[1] wurde im Laufe von anderen Untersuchungen immer wieder beobachtet, daß Blütenbildung zwar sowohl im Kurztag wie im Langtag eintritt, die Ausbildung männlicher und weiblicher Blüten bzw. Blütenstände durch die Tageslänge jedoch recht erheblich beeinflußt wird. Mitteilungen über ähnliche Beobachtungen liegen nur sehr wenige vor. Es schien daher von Interesse, diesen Effekt näher zu untersuchen und mit dem Einfluß von Gibberellinzusätzen zu kombinieren, da sich in vereinzelten, weiter unten zitierten Fällen ein Einfluß dieses Wirkstoffes auch auf die Geschlechtsausprägung gezeigt hatte.

Eine differenzierte Wirkung photoperiodischer Reize auf die Ausbildung männlicher und weiblicher Blüten bzw. Blütenteile beobachteten BORTHWICK u. SCULLY (1954) beim Hanf. Sie fanden, daß durch Kultur bei einer Tageslänge wesentlich unter der kritischen, ebenso wie durch relativ niedrige Temperatur und hohe Lichtintensität, das Auftreten männlicher Blüten an genetisch weiblichen Pflanzen gefördert wird. Über eine starke Verschiebung der Geschlechtsverteilung im Sinne einer Betonung des männlichen Geschlechtes unter Kurztagsbedingungen, ebenfalls beim Hanf, berichtete auch LACZYNSKA-HÚLEWICZOWA (1957). Weiterhin fanden HESLOP-HARRISON und HESLOP-HARRISON (1958) bei *Silene pendula*, einer Langtagspflanze, bei Kultur im Dauerlangtag von 21—22 Std täglicher Beleuchtung eine Unterdrückung von Androeceum und Corolle und eine Förderung des Gynoeceums.

Die Bedeutung der Gibberellinsäure für die Blütenbildung als solche geht aus zahlreichen Arbeiten der letzten Jahre hervor. Übersichten hierüber finden sich z. B. bei HARDER u. BÜNSOW (1958) und PENNER

[1] Das Saatgut wurde mir seinerzeit unter der Bezeichnung *Xanthium X 7* entgegenkommender Weise von Herrn Prof. Dr. G. MELCHERS zur Verfügung gestellt. Hierfür sei auch an dieser Stelle herzlich gedankt. Die Sorte ist S. 358 näher charakterisiert.

(1960). Mitteilungen über eine Beeinflussung des Geschlechtes durch Gibberellin sind nur vereinzelt gemacht worden. Galun (1959) beobachtete eine Verzögerung des Auftretens der ersten weiblichen Blüte und eine Verstärkung der männlichen Tendenz nach Gibberellinbehandlung an Gurken. Über Hemmung der Bildung weiblicher und Förderung der Bildung männlicher Blüten unter Gibberellineinfluß beim selben Objekt berichteten unlängst auch Wittwer u. Bukovac (1961). Hingegen beobachteten Resende u. Viana (1959) eine Reduktion des Androeceums nach Gibberellininjektion bei *Hyposcyamus niger*.

## Material und Methodik

Die Pflanzen wurden im Gewächshaus in Töpfen angezogen und wenige Tage nach der Keimung beginnend, im natürlichen, mindestens 15stündigen Langtag bzw. 9stündigen Kurztag gehalten. Bei den Kurztagsserien wurde durch Überstülpen lichtdichter Kästen von 18 Uhr abends bis 9 Uhr morgens die Tageslänge auf 9 Std reduziert. Sobald das erste Laubblattpaar eben entfaltet war und eine Länge von 15—20 mm erreicht hatte, wurde je einem Teil der Pflanzen alle 2 Tage, stets abends 18 Uhr, ein Tropfen Gibberellinlösung auf den Vegetationspunkt getropft. Die Lösung enthielt auf 100 ml dest. Wassers 5 mg Gibrel[1] und Netzmittel BASF. Waren die Pflanzen größer geworden, wurde die Gibberellinmenge auf drei Tropfen (je einen auf den Vegetationspunkt und die beiden jüngsten eben entfalteten Blätter) erhöht. Die Kontrollpflanzen erhielten nur Wasser + Netzmittel in gleicher Menge. Die statistische Sicherung der Ergebnisse wurde nach Pätau (1943) durchgeführt.

## Ergebnisse

Am 22. 5. ausgesäte Pflanzen von *Xanthium X 7* wurden am 4. 6. in vier Gruppen von je 10—12 Pflanzen geteilt. Je zwei Gruppen kamen in den 9stündigen Kurztag, zwei verblieben im natürlichen Langtag. Die Hälfte jeder Gruppe wurde in der geschilderten Weise bis zum vollen Erblühen alle 2 Tage mit Gibberellin behandelt, die restlichen Pflanzen dienten als Kurztags- bzw. Langtagskontrollen.

*Xanthium X 7* gehört zum Formenkreis *Xanthium strumarium*. Die vielblütigen männlichen Inflorescenzen bilden sich am Ende des Haupttriebes und auch als Achselsprosse, die zweiblütigen weiblichen Inflorescenzen stehen geknäuelt zu zweien oder dreien in den Achseln der oberen Blätter.

Sechs Tage nach Versuchsbeginn war die Gibberellinwirkung bereits deutlich zu sehen. Die Kurztags- und Langtagskontrollen waren etwa 5 cm hoch, die Gibberellinpflanzen beider Serien etwa 10 cm. Die Kurztagskontrollen zeigten je einen jungen männlichen Endblütenstand von 3—4 mm Durchmesser. Bei den Kurztags-Gibberellinpflanzen war die

[1] Gibrel, das Kaliumsalz der Gibberellinsäure, wurde mir entgegenkommender Weise von der Firma Merck, Sharp & Dohme, Haarlem, zur Verfügung gestellt, wofür auch an dieser Stelle bestens gedankt sei.

Blütenstandsanlage ebenfalls sichtbar, aber noch kleiner und weniger weit entwickelt. Bei den Langtagskontrollen war nur die erste Anlage eines Endblütenstandes zu sehen, bei den Langtags-Gibberellinpflanzen auch dies nur in einigen Fällen. *Das erste Auftreten von Blütenständen wurde also durch den Kurztag leicht gefördert, durch das Gibberellin etwas verzögert.*

15 Tage später hatten bereits alle Pflanzen reichlich Blüten angesetzt, sowohl männliche wie auch weibliche. Wiederum waren die im Kurztag gehaltenen Pflanzen in der Entwicklung der Blütenstände etwas voraus, doch zeigten die im Langtag gezogenen Pflanzen eine deutliche Förderung der Zahl männlicher Blütenstände. Der männliche Endblütenstand besaß bei ihnen 2—3 seitliche Verzweigungen und in den Achseln der obersten Blätter traten neben weiblichen regelmäßig auch männliche Blütenstände auf, was bei den im Kurztag erwachsenen Pflanzen nur ganz vereinzelt beobachtet wurde, und zwar nur bei den Kontrollen.

Die eingehende Protokollierung der Pflanzen erfolgte am 27. 6., die Ergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben. In der Kurztags- und in der Langtags-Kontrollserie waren Pflanzenhöhe und Blattzahl praktisch gleich, die Gibberellinpflanzen erwartungsgemäß wesentlich höher, besonders die im Langtag gehaltene Serie, deren Pflanzen auch durchschnittlich zwei Blätter mehr gebildet hatten.

In der Blütenbildung kommt vor allem der Einfluß der *Tageslänge* zum Ausdruck. Es zeigt sich eine *klare Förderung der Anzahl männlicher Inflorescenzen im Langtag bei gleichzeitiger Verzögerung der Entwicklung weiblicher Blütenstände.* Daß es sich bei den männlichen Inflorescenzen um eine absolute Vermehrung der Anzahl, bei den weiblichen hingegen nur um eine Entwicklungsverzögerung handelt, geht aus der weiteren Entwicklung der Pflanzen hervor (Tabelle 2).

Wesentlich geringer und auch schwerer zu beurteilen ist die Wirkung des Gibberellins auf die Blütenbildung. Die Blütenstandszahlen können aus den eben genannten Gründen erst im Zusammenhang mit den Werten von Tabelle 2 besprochen werden. Doch ergäben sich jetzt schon Unterschiede in der Größe und im Blühzustand der Inflorescenzen bei den verschiedenen Serien, die in der letzten Spalte von Tabelle 1 skizziert und durch die Abb. 1 und 2 belegt sind. Alle Abbildungen sind im gleichen Maßstabe aufgenommen und wiedergegeben, sie wurden am 28. 6. gemacht. Die hier interessierenden Punkte sind in den Abbildungstexten erläutert. Ohne auf Einzelheiten hier schon einzugehen, läßt sich allgemein eine leichte Hemmung bzw. Verzögerung in der Ausbildung der Blütenstände in den beiden Gibberellinserien erkennen.

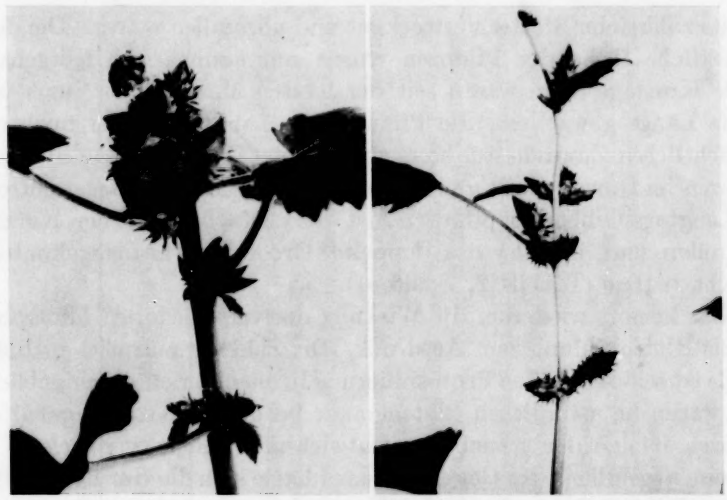
Die Entwicklung der Pflanzen wurde weiter beobachtet und am 18. 7. abschließend protokolliert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Blattzählungen wurden diesmal nicht mehr vorgenommen, da

Tabelle 1. *Xanthium X 7*

Größen- und Blütenverhältnisse 5 Wochen alter Pflanzen bei Kultur im Kurztag und im Langtag mit und ohne Gibberellin.

| | Mittlere Höhe cm | Mittlere Blattzahl Blätter | | Blütenstände | | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | voll entwickelt | klein | männlich | weiblich | |
| Kurztag, Kontrolle | $19{,}5 \pm 1{,}2$ | 6,0 | 1,5 | $2{,}27 \pm 0{,}24$ | $14{,}73 \pm 0{,}54$ | Endblütenstand ein kräftiges männliches Köpfchen, nicht verzweigt. In den Achseln der gipfelnahen Blätter meist drei weibliche Inflorescenzen, gelegentlich auch zwei weibliche und eine männliche. Pflanzen voll blühend (Abb. 1a) |
| Kurztag, Gibberellin | $43{,}8 \pm 0{,}6$ | 6,2 | 1,7 | $1{,}00 \pm 0{,}00$ | $13{,}83 \pm 0{,}88$ | Endblütenstand ein kleines männliches Köpfchen, nicht verzweigt. Blütenstandsstiel stark gestreckt. In den Achseln der oberen Blätter 2—3 weibliche Inflorescenzen, sitzend Pflanzen blühend (Abb. 1b) |
| Langtag, Kontrolle | $18{,}3 \pm 1{,}0$ | 6,4 | 1,8 | etwa 6 [1] | etwa 5 [1] | Endblütenstand ein kräftiges männliches Köpfchen mit zwei bis drei seitlichen männlichen Köpfchen. Endköpfchen kurz vor dem Aufblühen, Seitenköpfchen noch weiter zurück In den Achseln der gipfelnahen Blätter männliche und weibliche Inflorescenzen, die unteren noch sehr junge Knospen, nicht immer sicher zu diagnostizieren (Abb. 2a) |
| Langtag, Gibberellin | $56{,}2 \pm 0{,}8$ | 7,7 | 2,4 | etwa 6 [1] | etwa 7 [1] | Endblütenstand ein kleines männliches Köpfchen mit meist drei seitlichen männlichen Köpfchen. Alle im Knospenstadium. Inflorescenzstiele stark gestreckt, In den Achseln der oberen Blätter z.T. männliche und weibliche Inflorescenzen, z.T. nur männliche, alle noch als relativ kleine Knospen, nicht immer sicher zu diagnostizieren (Abb. 2b) |

[1] Siehe Anmerkung in der rechten Spalte.



a b

Abb. 1. a *Xanthium X 7*, 5 Wochen alt, Kurztagskontrolle. Männlicher Endblütenstand blühend, unverzweigt; weibliche Blütenstände blühend. In den Achseln der oberen Blätter weibliche, teils auch männliche Fluorescenzen. b *Xanthium X 7*, 5 Wochen alt, seit 24 Tagen mit Gibberellin behandelte Pflanze aus dem Kurztag. Männlicher Endblütenstand unverzweigt, kleiner und armblütiger als bei den Kontrollen. Blühend, mit verlängertem Stiel. Weibliche Blütenstände blühend. In den Achseln der oberen Blätter nur weibliche Inflorescenzen. Im ganzen schmächtiger als die Kontrollen, auch im Inflorescenzbereich gestreckt

a b

Abb. 2. a *Xanthium X 7*, 5 Wochen alt, Langtagskontrolle. Ein kräftiger und reichblütiger männlicher Endblütenstand mit 2—3 seitlichen Inflorescenzen. Terminale Inflorescenz eben aufblühend, seitliche Inflorescenzen mit großen Knospen. Auch in den Achseln der oberen Blätter kräftige männliche Inflorescenzen mit Knospen. Einige weibliche Blüten in den Achseln der obersten 2—3 Blätter im Aufblühen. In den tiefer gelegenen Blattachseln neben männlichen Inflorescenzen noch sehr junge Anlagen weiterer weiblicher Köpfchen. b *Xanthium X 7*, 5 Wochen alt, seit 24 Tagen mit Gibberellin behandelte Pflanze aus dem Langtag. Männlicher Endblütenstand mit 2—3 seitlichen Inflorescenzen, kleiner und armblütiger als bei den Kontrollen, noch ziemlich junge Knospen. In den Achseln der oberen Blätter hier ebenfalls gestielte männliche, z. T. auch männliche und weibliche Inflorescenzknospen, letztere meist noch sehr jung. Im ganzen schmächtiger als die Kontrollen, auch die Blütenstandsregion stark gestreckt

bereits zahlreiche Blätter vertrocknet und abgefallen waren. Die durchschnittliche Höhe der Pflanzen wurde nur summarisch festgehalten. Beide Kurztagsserien waren seit der letzten Messung nur noch wenig in die Länge gewachsen, die Pflanzen im Langtag hatten noch einen beträchtlichen Zuwachs erfahren, so daß jetzt die Kurztags-Gibberellinpflanzen im Durchschnitt gleich groß waren wie die Langtagskontrollen, die Langtags-Gibberellinpflanzen fast die vierfache Höhe der Kurztagskontrollen und beinahe die doppelte Größe der Langtagskontrollen erreicht hatten (Tabelle 2, Spalte 1).

Klar kommt wiederum die Wirkung der verschiedenen *Photoperiode* auf die Blütenbildung zum Ausdruck. Die Zahl der männlichen Blütenstände ist seit der letzten Protokollierung in allen Serien gleich geblieben, doch waren die männlichen Blütenstände bei den im Kurztag gehaltenen Pflanzen infolge der schnelleren Entwicklung bereits vertrocknet und teilweise abgefallen. Im Gegensatz dazu hatte sich die durchschnittliche Zahl weiblicher Inflorescenzen allgemein noch erhöht, außer bei der Kurztags-Gibberellinserie, sogar sehr erheblich. *Die Vermehrung der Zahl männlicher Blütenköpfchen durch Kultur im Langtag ist demnach auch bei den voll erwachsenen Pflanzen unverändert erhalten geblieben.* Die anfängliche Verzögerung in der Ausbildung weiblicher Inflorescenzen im Langtag wurde jedoch aufgeholt und führte vor allem bei der Langtags-Gibberellinserie zu einer starken Vermehrung der weiblichen Inflorescenzen. Hierdurch wurde diese Gruppe mit durchschnittlich 30 Blütenständen je Pflanze zur reichblütigsten Serie des ganzen Versuches. Hierauf muß im nächsten Abschnitt noch näher eingegangen werden.

Vielfältiger und nicht so einheitlich war die Wirkung der *Gibberellinbehandlung* auf die Blütenbildung allgemein und auf das Verhältnis der männlichen zu den weiblichen Inflorescenzen bzw. Blüten. Die Gibberellinpflanzen besaßen im Kurztag signifikant weniger männliche und auch weniger weibliche Inflorescenzen als die Kontrollen[1]. Da die männlichen Inflorescenzen außerdem noch erheblich kleiner und ärmer an Einzelblüten waren (s. a. Abb. 1a und b), sind die Differenzen bezogen auf männliche *Einzel*blüten noch wesentlich größer. Leider konnte die Zahl der Einzelblüten je Köpfchen zu diesem Zeitpunkt nicht mehr festgestellt werden. Für die stets zweiblütigen weiblichen Inflorescenzen geben die Zahlenwerte dementsprechend auch das wahre Verhältnis der Einzelblüten wieder. *Ein hemmender Einfluß des Gibberellins auf die Blütenbildung ist im Kurztag demnach nicht nur in zeitlicher Hinsicht, wie schon bei der ersten Protokollierung, sondern auch in bezug auf die endgültige Zahl der gebildeten männlichen und weiblichen Blüten festzustellen.*

[1] Alle in der Arbeit angeführten Differenzen wurden nach dem t-Test (Pätau 1943) auf ihre Signifikanz geprüft und sind statistisch sehr gut gesichert ($P = 0{,}0004$ und besser).

Tabelle 2. *Xanthium X 7*

Größen- und Blütenverhältnisse 8 Wochen alter Pflanzen bei Kultur im Kurztag und im Langtag mit und ohne Gibberellin.

| | Ungefähre Höhe cm | Blütenstände | | | | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | männlich | weiblich | insgesamt | männlich-weiblich | |
| Kurztag, Kontrolle | 25 | $2{,}27 \pm 0{,}24$[1] | $21{,}92 \pm 0{,}77$ | 24 | 1:9,6 | Männliche Endblütenstände vertrocknet und meist schon abgefallen<br>In den Blattachseln in der Regel nur weibliche Inflorescenzen, gelegentlich auch verkümmerte männliche |
| Kurztag, Gibberellin | 50 | $1{,}00 \pm 0{,}00$[1] | $15{,}50 \pm 0{,}54$ | 16 | 1:15,5 | Männliche Endblütenstände vertrocknet und meist schon abgefallen<br>In den Blattachseln nur weibliche Inflorescenzen, kleiner als bei den Kontrollen |
| Langtag, Kontrolle | 50 | $5{,}80 \pm 0{,}49$ | $16{,}60 \pm 0{,}99$ | 22 | 1:2,9 | Männliche Endblütenstände noch blühend oder eben verblüht, groß und mit drei bis vier männlichen Seitenblütenständen<br>In den Blattachseln männliche und weibliche Inflorescenzen |
| Langtag, Gibberellin | 90 | $6{,}17 \pm 0{,}36$ | $24{,}17 \pm 1{,}00$ | 30 | 1:3,9 | Männliche Inflorescenzen verblüht und meist vertrocknet.<br>Männliche Endblütenstände mit drei bis vier männlichen Seitenblütenständen<br>In den Blattachseln männliche und weibliche Inflorescenzen. Die weiblichen Inflorescenzen wiederum kleiner als bei den Kontrollen |

[1] Werte vom 27. 6. (Tabelle 1).

Anders wirkte sich die Gibberellinbehandlung bei Kultur im Langtag aus. Die durchschnittliche Zahl männlicher Inflorescenzen ist bei Kontrollen und Versuchspflanzen praktisch gleich, da aber wiederum die Blütenstände der Kontrollen größer und blütenreicher waren als die der mit Gibberellin behandelten Versuchspflanzen, ist die Zahl der je Pflanze gebildeten männlichen *Einzel*blüten auch hier in der Gibberellinserie niedriger als bei den Kontrollen. *Sicher und eindeutig erhöht ist im Langtag jedoch der Wert für die weiblichen Inflorescenzen bzw. Blüten.*

*Die Blütenbildung insgesamt erscheint dadurch unter Gibberellineinfluß im Kurztag gehemmt, im Langtag gefördert* (Tabelle 2, vorletzte Spalte). Für die Beurteilung dieser gegensinnigen Reaktion der Gibberellin-Pflanzen im Kurztag und im Langtag ist wichtig, daß die Langtags-Gibberellinpflanzen im Durchschnitt zwei Blätter mehr entwickelten als die Pflanzen aller anderen Serien. Sie besaßen damit aber auch zwei junge, Inflorescenzen tragende Blattachseln mehr. Rechnet man hierfür etwa 1—2 männliche und 4—6 weibliche Blütenstände, so läßt sich die abweichende Reaktion der im Langtag gehaltenen und mit Gibberellin behandelten Serie mindestens zum Teil mit großer Wahrscheinlichkeit auf diese allgemeine Wachstumsförderung zurückführen.

Da sich die Erhöhung der Blattzahl offensichtlich auf die Blütenstände beider Geschlechter auswirkte, ist das Verhältnis der männlichen zu den weiblichen Inflorescenzen auch im Langtag bei den Gibberellinpflanzen im selben Sinne gegenüber den Kontrollwerten verschoben wie im Kurztag.

Vergleicht man das Verhältnis der männlichen zu den weiblichen Inflorescenzen (Tabelle 2, letzte Spalte), so läßt sich zweierlei erkennen: einmal die schon besprochene Erhöhung der Zahl männlicher Inflorescenzen durch die Kultur im Langtag, zum anderen, daß sowohl *im Langtag wie auch im Kurztag bei den Gibberellinserien jeweils mehr weibliche Inflorescenzen auf eine männliche treffen als bei den entsprechenden Kontrollen.* Erreicht wird dieser Effekt im Kurztag durch die relativ stärkere Verringerung der Zahl männlicher Inflorescenzen, im Langtag durch die vergleichsweise stärkere Erhöhung der Zahl weiblicher Blütenstände bei den Gibberellinpflanzen.

Anhangsweise sei noch auf einen weiteren, morphologischen Effekt der Gibberellinbehandlung hingewiesen. Neben der allgemeinen Streckung der Internodien wurde auch die Blattform stark beeinflußt, wie dies auch bei anderen Objekten, z. B. Tomaten (Kiermayer 1960) beobachtet wurde. Während alle Kontrollpflanzen von *Xanthium* große und kräftige Blätter mit herzförmig ausgeschnittenem Blattgrund zeigten (Abb. 1a und 2a) waren die Blätter der mit Gibberellin behandelten Pflanzen etwas kleiner, zarter und gingen am Blattgrund allmählich verschmälert in den Blattstiel über (Abb. 1b und 2b).

## Besprechung der Ergebnisse

Aus den spärlichen bisher veröffentlichten Beobachtungen läßt sich, wie in der Einleitung erwähnt, ersehen, daß bei mehreren Objekten durch Kurztagsbehandlung und durch Gibberellinwirkung die Bildung männlicher Blüten bzw. Blütenteile gefördert und das Auftreten weiblicher Blüten verzögert wird. Durch Langtagskultur hingegen wird die Entwicklung weiblicher Blüten und Blütenteile begünstigt. RESENDE u. VIANA (1959) erhielten dagegen bei *Hyoscyamus* nach Gibberellininjektion Blüten mit reduziertem Androeceum, bei *Byrophyllum* beobachteten sie nach anfänglicher Förderung der männlichen Blüten einer subgynözischen Rasse im weiteren Verlauf gleichfalls eine Verweiblichung ihrer Versuchspflanzen und deuteten dies im Sinne ihrer Wuchsstofftheorie der Blütenbildung.

*Xanthium X 7* ist, wie aus den hier mitgeteilten Versuchen hervorgeht, annähernd tagneutral. Es blüht sowohl im Kurztag wie im Langtag. Genau genommen ist die Form jedoch als ganz schwache Kurztagspflanze anzusehen, sie blüht im Kurztag etwas früher. Während Langtags- und Lang-Kurztags-Pflanzen im Kurztag durch Gibberellin zum Blühen gebracht werden können (BÜNSOW u. HARDER 1956, BÜNSOW 1958, PENNER 1960, in diesen Arbeiten auch weitere Literatur), konnte bei Kurztagspflanzen bei Kultur im Langtag niemals Blütenbildung erreicht werden. HARDER u. BÜNSON (1956, 1957) beobachteten an kurztagsinduzierter *Kalanchoë Bloßfeldiana* sogar eine Hemmung der Blütenbildung durch Gibberellin. KHUDAIRI (1960) hingegen konnte bei Kurztagsrassen von *Xanthium pennsylvanicum* und *Xanthium strumarium* durch Auftropfen von Gibberellinlösung auf Achselknospen die Blütenbildung bei Kultur im Kurztag, gemessen am Knospendurchmesser der terminalen männlichen Inflorescenz, fördern. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch LINCOLN u. HAMNER (1958). Es gelang ihnen bei *Xanthium pennsylvanicum* zwar nicht an intakten, wohl aber an teilweise entblätterten Pflanzen bei schwacher Kurztagsinduktion, die Blütenbildung zu verstärken. An einem weiteren Objekt, der Kurztagspflanze *Pharbitis Nil* konnten OGAWA u. IMAMURA (1958) den Effekt einer einmaligen Kurztagsexposition durch Bepinseln der Keimblätter mit Gibberellinlösung wesentlich steigern und den Prozentsatz blühender Pflanzen erheblich vergrößern. Terminalblüten wurden hierbei überhaupt nur bei den mit Gibberellin behandelten Pflanzen angelegt. Im selben Sinne, vielleicht noch eindrucksvoller, verliefen spätere Versuche mit Diffusaten aus unreifen Samen von *Pharbitis Nil* und *Phaseolus vu garis* (OGAWA u. IMAMURA 1960).

In den vorliegenden Versuchen wurde durch die Gibberellinbehandlung die Blütenbildung in den *Kurztags*serien, gemessen an der Gesamt-

zahl der Inflorescenzen, wie auch an den Einzelwerten für die männlichen und weiblichen Blütenstände eindeutig herabgesetzt.

Diese Versuche sind mit denen von Lincoln u. Hamner (1958) nicht direkt vergleichbar. Lincoln u. Hamner verwendeten Versuchspflanzen, deren Meristeme (Knospen und jüngste Blätter) entfernt worden waren und beobachteten dann eine Förderung der Blütenbildung durch Gibberellin nach suboptimaler Kurztagsinduktion. Außerdem ist das von ihnen verwendete *Xanthium pennsylvanicum* eine gut ausgeprägte Kurztagspflanze. An intakten Pflanzen, wie sie in den vorliegenden Versuchen verwendet wurden, konnten sie keinen Gibberellineinfluß auf die Blütenbildung feststellen. Wenn hier, bei *Xanthium X 7* die Blütenbildung im Kurztag durch Gibberellin gehemmt ist, so läßt sich das im Sinne von Lincoln u. Hamner so deuten, daß die intakten Versuchspflanzen unter den optimalen Bedingungen ständiger Kurztagskultur in ihren Meristemen und jungen Blättern bereits so viel Wirkstoffe (Auxine, vielleicht auch Gibberelline) bilden konnten, daß weitere Zufuhr von Gibberellin bereits überoptimale und damit wieder hemmende Wirkstoffkonzentration ergab. Hierauf deutet vielleicht auch das Ergebnis der noch zu besprechenden Langtagsversuche.

Das Verhältnis männlicher zu weiblichen Inflorescenzen und, wie bereits erwähnt, noch mehr das Verhältnis männlicher zu weiblichen Einzelblüten wurde durch die Gibberellinbehandlung zugunsten der weiblichen Blüten verschoben. Das Ergebnis entspricht hiermit den Beobachtungen von Resende u. Viana (1959), die bei der Langtagspflanze *Hyoscyamus niger* und im ganzen gesehen auch der Lang-Kurztags-Pflanze *Bryophyllum daigremontianum* durch Gibberellingaben eine Verweiblichung ihrer Versuchspflanzen erzielten, während Galun (1959) sowie Wittwer u. Bukowac (1961) an Gurken eine Förderung der Ausbildung männlicher Blüten unter Gibberellineinfluß feststellten.

An den beiden im Langtag kultivierten Serien fällt vor allem die schon im experimentellen Teil besprochene starke und eindeutige Förderung der männlichen Inflorescenzen durch den Langtag auf. In dieser Hinsicht reagierte *Xanthium X 7* entgegengesetzt wie Hanf, bei welchem im Kurztag die Bildung männlicher Blüten gefördert wurde (Borthwick u. Scully 1954 und Laczynska-Hulewiczowa 1957) und auch anders als *Silene pendula*, bei welcher Heslop-Harrison u. Heslop-Harrison (1958) im Langtag eine Förderung der weiblichen und eine Unterdrückung der männlichen Blütenteile beobachteten, denselben Effekt, der auch nach Wuchstoffgaben auftrat.

Die Gibberellinwirkung bei den *Langtags*serien ist deshalb etwas schwieriger zu beurteilen, weil die Pflanzen der Langtags-Gibberellin-Serie durchschnittlich zwei Blätter mehr entwickelt hatten als die Langtagskontrollen und die beiden Kurztagsserien. Die gleich hohe

Zahl männlicher und vor allem die Vermehrung weiblicher Inflorescenzen dürfte daher hier, wie bereits angeführt, wenigstens teilweise auf die vermehrte Anzahl blütenbildender Achselknospen zurückzuführen sein. Die Zahl männlicher *Einzel*blüten ist hier durch die Verkleinerung der männlichen Inflorescenzen bei den Gibberellinpflanzen so wie im Kurztag bei den Gibberellinpflanzen vermindert, für die weiblichen Inflorescenzen bzw. Einzelblüten ist *absolut* eine klare und signifikante Vermehrung festzustellen. Auch wenn man 4—5 weibliche Inflorescenzen für die beiden zusätzlich gebildeten Blätter abzieht, ergibt sich immer noch mindestens keine Verminderung, verglichen mit den um zwei Blätter ärmeren Kontrollen. Das Verhältnis männlicher zu weiblichen Inflorescenzen ist auch im Langtag bei der Gibberellinserie gegenüber den Kontrollen zugunsten der weiblichen Inflorescenzen verschoben.

Die im Kurztag sehr deutliche Verminderung der durchschnittlichen Blütenzahl und der ganz andere Effekt im Langtag lassen sich wiederum im Sinne von Lincoln u. Hamner (1958) verstehen. Im Kurztag, unter optimalen Blühbedingungen, wirkt zusätzliches Gibberellin bei den schon optimal mit Wirkstoff versehenen Pflanzen hemmend auf die Blütenbildung, im Langtag, der für die Blütenbildung nicht so günstig ist, wirkt zusätzliches Gibberellin fördernd. Es ist hierbei unwesentlich, ob man das Gibberellin als nativen, in den Meristemen gebildeten und im Verein mit Auxin wirkenden Wuchsstoff auffaßt (Lincoln u. Hamner), oder als einen Hemmstoffe neutralisierenden Faktor (Brian 1958). Resende u. Viana (1959) deuten ihre Ergebnisse an *Hyoscyamus* und *Bryophyllum* überhaupt in der Weise, daß sie einen Gibberellinzusatz als eine Erhöhung des Wuchsstoffspiegels ihrer Versuchspflanzen ansehen. Ihrer Ansicht nach sind für den Übergang vom vegetativen zum generativen Stadium quantitative Unterschiede im Auxingehalt, nicht besondere Blühhormone verantwortlich zu machen. Blühende Pflanzen sollen weniger Wuchsstoff enthalten als nichtblühende, das Androeceum bzw. männliche Blüten „generativer" sein als das Gynoeceum bzw. weibliche Blüten, und daher bei Erhöhung des Wuchsstoffspiegels im kritischen Bereich zuerst unterdrückt werden. Sie vertreten hierbei eine Auffassung, die in ganz ähnlicher Weise Laibach u. Kribben (1950, 1951) und Laibach (1952) auf Grund ihrer Versuche vor allem an Gurken und Kürbis entwickelt haben.

In den vorliegenden Versuchen wurde durch die Gibberellinbehandlung sowohl im Langtag wie im Kurztag das Verhältnis der männlichen zu den weiblichen Blütenständen zugunsten der weiblichen Inflorescenzen verschoben. *Xanthium X 7* reagierte diesbezüglich auf eine Gibberellinzufuhr im selben Sinne wie *Hyoscyamus* und *Bryophyllum* in den Versuchen von Resende u. Viana. Daß allerdings ein Vergleich von Versuchen mit Gibberellin und mit Wuchsstoffen wie Indolylessigsäure bzw.

α-Naphthylessigsäure nur sehr bedingt möglich ist, Gibberelline und Wuchsstoffe im engeren Sinne (Auxine) durchaus verschiedene Wirkungen und Angriffspunkte besitzen, wie dies vor kurzem auch Brian (1958) betonte, zeigen auch die vorliegenden Versuche. Während bei *Xanthium* die Gibberellinzugabe ähnlich wie ein Wuchsstoffzusatz die Bildung männlicher Blüten hemmte, hat die gleiche Behandlung bei Gurken, dem Hauptversuchsobjekt von Laibach u. Kribben, die entgegengesetzte Wirkung und fördert bei diesem Objekt nach Galun (1959) sowie Wittwer & Bukowac (1961) gerade die Bildung der männlichen Blüten.

Es wäre naheliegend, zu versuchen, diese verschiedenen Reaktionsweisen mit einem unterschiedlichen photoperiodischen Charakter der Versuchspflanzen in Zusammenhang zu bringen. Die bisherigen Ergebnisse bieten hierzu aber keine Handhabe und sprechen eher dagegen. Ob eine umfassende Deutung im Sinne einer Wuchsstofftheorie der Blütenbildung möglich ist, könnten erst weitere und speziell hierauf ausgerichtete Versuche entscheiden.

## Zusammenfassung

*Xanthium X 7*, eine fast tagneutrale Form von *Xanthium strumarium* mit leichtem Kurztagspflanzen-Charakter wurde im Kurztag und im Langtag kultiviert und gleichzeitig mit Gibberellin behandelt. Die Bildung männlicher und weiblicher Inflorescenzen und das gegenseitige Verhältnis beider Blütenstandstypen zueinander wurden beobachtet. Die wesentlichsten Ergebnisse waren:

Kultur im Langtag brachte absolut und relativ eine starke Erhöhung der Anzahl männlicher Inflorescenzen je Pflanze und verzögerte das Auftreten und die Entwicklung weiblicher Blütenstände.

Gibberellinzusatz ergab in beiden Photoperioden eine leichte Verzögerung der Blütenbildung, im Kurztag außerdem eine Verminderung der Zahl der je Pflanze gebildeten männlichen und weiblichen Blütenstände.

Das gegenseitige Verhältnis der männlichen zu den weiblichen Blütenständen wurde durch Gibberellinzusatz in beiden Photoperioden gleichsinnig zugunsten der weiblichen Inflorescenzen verschoben.

Die Ergebnisse werden diskutiert, vor allem im Zusammenhang mit Hypothesen über die Rolle der Wuchsstoffe bei der Blütenbildung.

## Literatur

Borthwick, H. A., and N. J. Scully: Photoperiodic responses of hemp. Bot. Gaz. **116**, 14—29 (1954).

Brian, P. W.: Role of Gibberellin-like hormones in regulation of plant growth and flowering. Nature (Lond.) **181**, 1122—1123 (1958).

Bünsow, R.: Anwendungsmöglichkeiten der Gibberelline. Angew. Bot. **32**, 186 bis 196 (1958).

—, u. R. Harder: Blütenbildung von *Lapsana* durch Gibberellin. Naturwissenschaften **43**, 527 (1956).

— — Blütenbildung von *Bryophyllum* durch Gibberellin. Naturwissenschaften **43**, 479—480 (1956).

Galun, E.: Effects of gibberellic acid and naphthaleneacetic acid on sex expression and some morphological characters in the cucumber plant. Phyton (Argentinia), **13**, 1—8 (1959).

Harder, R., u. R. Bünsow: Einfluß des Gibberellins auf die Blütenbildung bei *Kalanchoë bloßfeldiana*, Naturwissenschaften **43**, 544 (1956).

— — Zusammenwirken von Gibberellin mit photoperiodisch bedingten blühfördernden und blühhemmenden Vorgängen bei *Kalanchoë bloßfeldiana*. Naturwissenschaften **44**, 454 (1957).

— — Über die Wirkung von Gibberellin auf Entwicklung und Blütenbildung der Kurztagspflanze *Kalanchoë bloßfeldiana*. Planta (Berl.) **51**, 201—222 (1958).

Heslop-Harrison, J., and Y. Heslop-Harrisson: Photoperiod, Auxin and sex balance in al long-day-plant. Nature (Lond.) **181**, 100—102 (1958a).

— — Long-day and auxin induced male sterility in *Silene pendula* L. Port. Acta biol. A **5**, 79—94 (1958b).

Khudairi, A. K.: Effect of streptomycin on the flowering of two *Xanthium* species. Physiol. Plantarum (Cph.) **13**, 1—8 (1960).

Kiermayer, O.: Die formative Wirksamkeit der 2.3.5-Trijodbenzoesäure (TIBA) in Gegenwart von Gibberellinsäure (GA). Planta (Berl.) **55**, 153—168 (1960).

Laczynska-Hulewiczowa, T. (1957): Zit. nach H. Linskens, Physiologie der Fortpflanzung und Sexualität. Fortschr. Bot. **21** (1958).

Laibach, F.: Wuchsstoff und Blütenbildung. Beitr. Biol. Pflanz. **29**, 129—141 (1958).

Laibach, F., u. F. J. Kribben: Der Einfluß von Wuchsstoff auf die Blütenbildung der Gurke. Naturwissenschaften **37**, 114—115 (1950).

— — Die Bedeutung des Wuchsstoffs für die Bildung und Geschlechtsbestimmung der Blüten. Beitr. Biol. Pflanz. **28**, 131—144 (1951).

Lincoln, R. G., and K. C. Hamner: An effect of gibberellic acid on the flowering of *Xanthium*, a short-day-plant. Plant Physiol. **33**, 100—104 (1958).

Ogawa, Y., u. S. Imamura: Über die fördernde Wirkung von Gibberellin auf die Blütenbildung einer Kurztagspflanze, *Pharbitis Nil Chois*. Proc. Jap. Acad. **34**, 629—630 (1958).

— — Über die Wirkung der Pflanzendiffusate auf die Streckung des Sprosses und die Blütenbildung von *Pharbitis Nil Chois*. Bot. Mag. (Tokyo) **73**, 125—132 (1960).

Penner, J.: Über den Einfluß von Gibberellin auf die photoperiodisch bedingten Blühvorgänge bei *Bryophyllum*. Planta (Berl.) **55**, 542—572 (1960).

Pätau, K.: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen. Biol. Zbl. **63**, 152—168 (1943).

Resende, F., and M. J. Viana: Gibberellin and sex expression. Port. Acta biol., A **6**, 77—98 (1959).

Wittwer, S. H., and M. J. Bukovac: Some gibberellin effects on flowering of plants. Ber. Sympos. „Eigenschaften und Wirkungen der Gibberelline". Oberhess. Ges. für Natur- u. Heilkunde, Gießen, 1961.

Prof. Dr. H. v. Witsch,
Botanisches Institut der Techn. Hochschule,
München, Freising-Weihenstephan

Planta 57, 370—390 (1961)

Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn

# URSACHEN DER FROSTRESISTENZ BEI WINTERWEIZEN

## IV. Mitteilung

## DAS VERHALTEN VON FERMENTEN UND FERMENTSYSTEMEN GEGENÜBER TIEFEN TEMPERATUREN*

Von

H. Ullrich und U. Heber

Mit 1 Textabbildung

*(Eingegangen am 13. Juli 1961)*

Frühere Untersuchungen zur Frage der Frostresistenz hatten ergeben, daß Atmung und Assimilation von Blättern in verschiedenem Grade frostempfindlich sind. Das weist auf eine Schädigung von Enzymproteinen als Trägern der betrachteten Stoffwechselvorgänge hin. Weiter zeigte es sich bei der Untersuchung von Zellfraktionen, daß ein bestimmter Teil der Plasmaeiweiße von Weizenblättern beim Einfrieren auf tiefe Temperaturen irreversibel koaguliert (Ullrich und Heber 1958, Heber 1958, 1959a). Zucker waren in der Lage, diese Frostfällungen zu verhindern. Diese in vitro erhaltenen Befunde weisen auffallende Parallelen auf zu alten und im großen und ganzen immer wieder bestätigten Befunden, nach denen frostresistente Pflanzen besonders hohe Zuckergehalte besitzen, während der Zuckergehalt dieser Pflanzen im frostempfindlichen Zustand im allgemeinen niedriger ist. Die bekannten Ausnahmen von dieser Regel lassen sich möglicherweise mittels unterschiedlicher Zuckerverteilung innerhalb der Zelle, nämlich in gewissen plasmatischen Komponenten und in der Vacuole, erklären: Die Resistenz kann nach unseren in vitro erhaltenen Befunden nur von dem Anteil der Zucker beeinflußt werden, der sich im Plasma befindet (Heber 1957, 1959). Zucker scheinen im übrigen nicht die einzigen Schutzstoffe zu sein.

Die Koagulation einer bestimmten Proteinfraktion durch Frost zeigt nun zwar eindeutig an, daß sich am Zustand der beteiligten Proteine etwas geändert hat, jedoch besagt das Ausfallen aus einer Lösung an sich nichts darüber, welcher Art die Änderung ist. Insbesondere besteht die Frage, ob das Ausfallen der von uns als „frostempfindlich" bezeichneten Proteinfraktion auf eine lediglich physikalisch bedingte Aggregation von Proteinteilchen als Gefrierfolge zurückzuführen ist oder ob eine chemisch bedingte Vernetzungsreaktion zu einem unlöslichen Körper führt, wie das ursprünglich von uns angenommen wurde. Letzteres

* Herrn Prof. Dr. W. Schumacher zum 60. Geburtstag gewidmet.

müßte zu einem Aktivitätsverlust von an der Koagulation beteiligten Fermentproteinen führen, ersteres nicht, zumindest nicht unmittelbar. Auch steht eine endgültige Klärung der Frage noch aus, welche Bedeutung eine Koagulation von Proteinen durch Frost, die in vitro bei Extrakten beobachtet wird, für die einer Frostwirkung ausgesetzte intakte Pflanze hat.

Welche Vorgänge der beobachteten Proteinkoagulation beim Gefrieren zugrunde liegen, läßt sich am besten über Aktivitätsmessungen an Fermenten prüfen, die auch in gewissem Ausmaße einen Rückschluß von den im in vitro-Experiment erarbeiteten Kenntnissen über die Frostwirkung auf die Pflanze selbst erlauben. Über diesbezügliche Untersuchungen soll im folgenden berichtet werden.

## Methodik

**1. Material.** Als Pflanzenmaterial wurden Blätter von Winterweizen verwandt. Die Pflanzen waren teils frostresistent, teils frostempfindlich und wurden im letzteren Falle im Gewächshaus angezogen. Meist gelangte frostempfindliches Material zur Untersuchung, da hier die Intensität der untersuchten fermentativen Umsetzungen oft wesentlich höher war als bei dormanten, frostresistenten Pflanzen. Prinzipielle Unterschiede im Verhalten von Proteinen aus empfindlichen und resistenten Blättern konnten nicht festgestellt werden.

In einigen Fällen wurden auch Spinatblätter gewählt.

**2. Chloroplastenisolierungen.** Chloroplasten wurden isoliert, indem im Mörser jeweils etwa 8 g Blätter mit Sand und der vierfachen Menge an Puffer der unten angegebenen Zusammensetzung verrieben wurden. Anschließend wurde 2 min bei 200 g, dann 10 min bei 1000 g zentrifugiert. Das Sediment der zweiten Zentrifugierung bestand größtenteils aus Chloroplasten, wie die mikroskopische Kontrolle ergab. Diese wurden in wenig Puffer von $p_H$ 7,8 aufgenommen. Als Isolierungspuffer diente eine Lösung von 0,4 m-Saccharose, 0,005 m-Ascorbat und 0,01 m-NaCl in 0,05 m-Trishydroxymethylaminomethan (Tris) von $p_H$ 8,4. Bisweilen wurde die Saccharose durch 0,35 m-NaCl ersetzt.

**3. Blattextrakt.** 15 g Blätter wurden mit 30 ml 0,05 m-Tris-Puffer, $p_H$ 8,4 homogenisiert. Nach Filtrieren durch ein Tuch lassen sich restliche Zellwandbestandteile durch 10 min Zentrifugieren bei 2000 g entfernen. Das dunkelgrüne Überstehende wird — dialysiert oder undialysiert — zur Fermentbestimmung verwendet. Es hat einen $p_H$-Wert zwischen 7,6 und 7,8.

**4. Frostempfindliche und frostunempfindliche Fraktion.** Der Blattextrakt wird 45 min bei 28000 g zentrifugiert, wobei alle grüngefärbten Bestandteile sedimentieren. Die überstehende braune Lösung läßt nach Einfrieren und Wiederauftauen keine Frostfällung erkennen und soll deshalb als „frostunempfindlich" bezeichnet werden. Das Sediment wird gewaschen und dann in so viel 0,05-Tris, $p_H$ 7,8 im Homogenisator der Firma Bühler, Tübingen aufgenommen, daß die Proteinkonzentration 1—2% beträgt. Da beim Gefrieren der dunkelgrün gefärbten Lösung nahezu alle Proteine ausfallen, werden diese als frostempfindlich bezeichnet.

**5. Fermentbestimmungen.** Die Aktivität der Katalase wurde auf manometrischem Wege nach CHANCE und MAEHLY (1955) bestimmt, diejenige der Glutaminsäuredecarboxylase nach HEBER (1960), der Äpfelsäuredehydrogenase nach MEHLER u. Mitarb. (1948), der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase nach LADUE u. Mitarb. (1954) sowie der Phosphoglucoseisomerase nach SLEIN (1955, Resorcin-

methode). Zur Bestimmung der Adenosintriphosphatase wurde folgendes Verfahren gewählt: Als Substrat fand 0,0026 m-Adenosintriphosphat (ATP) Verwendung in 0,05 m-Tris-Puffer, $p_H$ 7,9, der zudem 0,0065 m-$MgCl_2$ enthielt. Die in 15 min bei 22° C freigesetzte Phosphatmenge, die nach Fiske und Subbarow (1929) bestimmt wurde, diente als Maß der Enzymaktivität. Die Aktivität der Cytochromoxydase wurde auf zwei verschiedenen Wegen ermittelt, nämlich im manometrischen Test nach Kapeller-Adler (1949) und im optischen Test nach Smith (1954). In der Hill-Reaktion wurde die Reduktionsrate von $[Fe(CN)_6]^{---}$ im Licht als Maß der Enzymaktivität gewertet (Avron, Krogmann und Jagendorf 1958). Als Reaktionsmedium diente 0,013 m $K_3$ $[Fe(CN)_6]$ in 0,05 m-Tris, $p_H$ 7,9. Die photosynthetische Phosphorylierung nahmen wir nach den Angaben von Jagendorf und Avron (1958) mit Phenacinmethosulfat als Cofaktor vor, jedoch wurde aerob gearbeitet. Phosphatbestimmungen erfolgten nach Fiske und Subbarow (1929).

**6. Verschiedenes.** Chlorophyll wurde auf spektrophotometrischem Wege nach Arnon (1949) bestimmt. Proteinbestimmungen erfolgten gravimetrisch, und zwar wurde durch Frost oder mit Trichloressigsäure ausgefülltes Protein nach Waschen und Trocknen ausgewogen (vgl. Ullrich und Heber 1958). Die erhaltenen Proteinwerte sind wesentlich höher als diejenigen, die aus Kjeldahl-Bestimmungen herrühren. Das ist darauf zurückzuführen, daß die Proteine der frostempfindlichen Fraktion größere Mengen Lipoide (bis zu 30%) und Kohlenhydrate (etwa 10%) gebunden enthalten (vgl. Stoll und Wiedemann 1952, Heber 1959a).

Gefriertests an Pflanzen und Extrakten wurden in der Regel, wenn nichts anderes erwähnt ist, 15 Std bei —20° C durchgeführt. Die Pflanzen wurden dabei langsam, etwa im Verlaufe von 2—3 Std, auf die Versuchstemperatur gebracht und anschließend noch in gefrorenem Zustand verarbeitet. Kürzere Versuchszeiten als 15 Std bei Gefriertests an Extrakten fanden dann Anwendung, wenn zu befürchten war, daß auf Alterungsprozesse zurückgehende Aktivitätsminderungen der betreffenden Reaktion den Einfluß des Gefrierens überdecken.

Als Maß der Frostresistenz wird die Temperatur in °C bezeichnet, bei der 50% der geprüften Pflanzen erfrieren.

## Ergebnisse

### *Das Verhalten von Fermenten der löslichen, „frostunempfindlichen" Fraktion der Blatteiweiße gegenüber tiefen Temperaturen*

*a) Untersuchungen an Blattextrakten.* Friert man dialysierte und undialysierte (noch die niedermolekularen Inhaltsstoffe der Zelle einschließlich der Zucker enthaltende) Blattextrakte bei —20° C ein, so zeigt sich nach dem Auftauen, daß die grün gefärbten Proteide koaguliert sind und sich bald am Boden der dann bräunlich gefärbten Lösung absetzen. Die Aktivität verschiedener Enzyme in der Lösung blieb durch den Gefriervorgang nicht unbeeinflußt, wie aus Tabelle 1, A ersichtlich ist. Jedoch kann man offenbar hier nicht von einer weitgehenden Denaturierung der beteiligten Enzymproteine sprechen, da nach vorheriger Abtrennung der „frostempfindlichen" Eiweißfraktion aus dem Extrakt mittels Zentrifugieren bei 28000 g und anschließendem Einfrieren der verbleibenden Proteine der „frostunempfindlichen" Fraktion ein Aktivitätsabfall ebensowenig beobachtet werden kann wie eine Koagulation der eingefrorenen Proteine (Tabelle 1, B).

Der Aktivitätsabfall beim Gefrieren des unfraktionierten Extraktes kann auf zweierlei Weise erklärt werden:

1. Ein Teil der Enzymaktivität ist in der frostempfindlichen, ein anderer in der frostunempfindlichen Fraktion lokalisiert. Das würde voraussetzen, daß die Enzyme in verschiedener Form, gebunden oder ungebunden, in der Zelle existieren, wie das zuerst von RUHLAND (1913) und später vor allem von russischen Forschern angegeben wurde. Beim Gefrieren wird dann lediglich der frostempfindliche Anteil unter Aktivitätsverlust koaguliert, während der Anteil der frostunempfindlichen Fraktion wie diese selbst durch Gefrieren nicht gestört, ja sogar stabilisiert wird (vgl. das Aufbewahren von Enzymen in gefrorenem Zustand!).

Tabelle 1. *Der Aktivitätsverlust verschiedener, nicht strukturell gebundener Enzyme bei 12stündigem Einfrieren von Blattextrakten auf —20° C*

A. Blattextrakt, der etwa 90—95% der Blattproteine enthält

| Ferment | Aktivitätsverlust % |
|---|---|
| Katalase | 10—25 |
| Glutaminsäuredecarboxylase | etwa 15 |
| Äpfelsäuredehydrogenase | 0 |
| Glutamat-Oxalacetat-Transaminase | 20—40 |
| Phosphoglucoseisomerase | 0 |

B. Blattextrakt, der durch Zentrifugieren bei 28000 g von der frostempfindlichen Fraktion der Blatteiweiße befreit ist

| Ferment | Aktivitätsverlust % |
|---|---|
| Katalase | 0 |
| Glutamat-Oxalacetat-Transaminase | 0 |
| Äpfelsäuredehydrogenase | 0 |

2. Beim Ausfällen der „frostempfindlichen Fraktion" durch Gefrieren wird, je nach den Eigenschaften der beteiligten Enzyme, ein mehr oder weniger großer Anteil mitgerissen, ohne daß diese Enzyme ursprünglich in der partikulären, zentrifugierbaren frostempfindlichen Fraktion lokalisiert waren.

Es läßt sich nun eindeutig entscheiden, daß die zweite Möglichkeit den Tatsachen entspricht. Trennt man die frostempfindliche Fraktion durch Zentrifugieren von den frostunempfindlichen, löslichen Proteinen ab, so läßt sich in ihr nach entsprechendem Waschen keinerlei Aktivität der in Tabelle 1 angegebenen Enzyme nachweisen. Dagegen konnten wir in manchen Fällen sogar eine eindeutig erhöhte Enzymaktivität des Extraktes nach Abtrennen der frostempfindlichen Fraktion feststellen. Die frostempfindliche Fraktion vermag also eine begrenzte Hemmwirkung auf verschiedene lösliche Enzyme auszuüben.

Auch der Enzymanteil, der durch Gefrieren des Extraktes bei der Fällung der frostempfindlichen Fraktion der Eiweiße mitgerissen wird, denaturiert nicht, wenn wir hier unter Denaturierung den irreversiblen

Verlust der physiologischen Aktivität verstehen wollen. Nach Fein-Dispergierung der frostkoagulierten Proteine im Homogenisator kehrt nämlich die beim Gefrieren verlorengegangene Enzymaktivität wieder. Aktivitätsverlust oder Aktivitätsminderung erklären sich also wohl daraus, daß infolge Oberflächenverkleinerung und Inklusion in das Koagulat die Diffusion des Substrates zum Enzym stark herabgesetzt wird, soweit das Enzym in die Fällung mit einbezogen wurde.

*b) Gefrierexperimente an Blättern.* Nach der Feststellung, daß Enzyme der frostunempfindlichen Fraktion in vitro keine echte Beeinflussung ihrer Aktivität durch Gefrieren erkennen lassen, ergibt sich die Frage, ob der Frosttod von Blättern die Aktivität von daraus isolierten Enzymen der frostunempfindlichen Fraktion beeinflußt. Pflanzen wurden deshalb durch Frost abgetötet und unmittelbar nach Entnahme aus der Kältekammer wie üblich zur Enzymgewinnung aufgearbeitet. Tabelle 2 zeigt den Gehalt an Äpfelsäuredehydrogenase und Glutamat-Oxalacetat-Transaminase von frostgetöteten und von unbehandelten Blättern im Vergleich. Offenbar hat der Frosttod der Blätter die Enzymaktivität der untersuchten Fermente ebensowenig eindeutig beeinflussen können, wie das beim Gefrieren der frostunempfindlichen Fraktion in vitro der Fall war.

Tabelle 2. *Die Aktivität der Äpfelsäuredehydrogenase und der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase in durch Frost abgetöteten und in lebenden Blättern in Bücher-Einheiten/g Protein.* (Beisenherz u. Mitarb. 1953)

Äpfelsäuredehydrogenase

| Experiment | Durch Frost abgetötete Blätter | Kontrollblätter |
|---|---|---|
| 1 | $6{,}97 \cdot 10^4$ | $7{,}07 \cdot 10^4$ |
| 2 | $9{,}86 \cdot 10^4$ | $9{,}33 \cdot 10^4$ |
| 3 | $13{,}82 \cdot 10^4$ | $13{,}66 \cdot 10^4$ |

Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

| Experiment | Durch Frost abgetötete Blätter | Kontrollblätter |
|---|---|---|
| 1 | $1{,}07 \cdot 10^4$ | $1{,}19 \cdot 10^4$ |
| 2 | $1{,}32 \cdot 10^4$ | $1{,}28 \cdot 10^4$ |

Die Enzyme der frostunempfindlichen Fraktion lassen also, soweit untersucht, keine *unmittelbare* Beeinflussung durch Ausfrieren in vitro und in vivo erkennen. Eine *mittelbare* Beeinflussung kann aber insofern vorliegen, als diese Enzyme in die Frostfällung der frostempfindlichen Fraktion teilweise mit einbezogen werden.

### *Das Verhalten von Fermenten der partikulären, „frostempfindlichen" Fraktion der Blatteiweiße gegenüber tiefen Temperaturen*

Unter die Enzyme, die an sehr hochmolekulare Bestandteile der Zelle gebunden sind, und die daher der partikulären, frostempfindlichen Fraktion angehören, fallen unter anderem einige Fermente der Endoxydation, der Photosynthese und des Phosphatstoffwechsels, über die berichtet werden soll.

**1. Adenosintriphosphatase.** Ein erheblicher Anteil der Adenosintriphosphataseaktivität muß in der frostempfindlichen Fraktion lokalisiert sein, da sich das Enzym auch durch intensives Waschen nicht aus dem zentrifugierbaren Anteil der Proteine entfernen läßt. Wird nun die Frostfällung der empfindlichen Fraktion von einem Aktivitätsabfall der Adenosintriphosphatase begleitet? Das ist überraschenderweise und in Übereinstimmung mit Befunden von PORTER u. Mitarb. (1953) nicht der Fall, wie aus den Ergebnissen der Tabelle 3 ersichtlich ist. Trotz nahezu 100%iger Fällung der frostempfindlichen Fraktion ließ sich keine wesentliche Herabsetzung der ATP-ase-Aktivität feststellen. Dies ist um so erstaunlicher, als die Koagulation zu Oberflächenverkleinerung und zur Erschwerung der Heranführung von Substrat auf dem Diffusionswege führen muß. Offenbar sind die Umsatzzahlen des Enzyms so klein, daß die Substratzuführung trotz der Fällung nicht zum begrenzenden Faktor des Umsatzes wird. Ein Löslichwerden des Enzyms als Gefrierfolge kann nicht stattgefunden haben, da nach Abzentrifugieren der Fällung im Überstehenden keine Enzymaktivität mehr verbleibt. Denaturierung des Enzyms hat also trotz der beobachteten nahezu vollständigen Fällung nicht stattgefunden.

Tabelle 3. *Der Einfluß des Gefrierens auf die Aktivität der partikulär gebundenen Adenosintriphosphatase. Messung der Aktivität in Mikromolen freigesetzten Phosphats pro mg Eiweiß in der Stunde*

| | Frostempfindliche Fraktion | |
|---|---|---|
| Experiment | 15 Std −20 °C gefroren | 15 Std + 2 °C ungefroren |
| 1 | 0,475 | 0,450 |
| 2 | 0,370 | 0,400 |
| 3 | 0,581 | 0,581 |

**2. Cytochromoxydase.** *a) Untersuchungen an Blattextrakten.* Vorerst war zu klären, ob der Frostfällung der frostempfindlichen Fraktion ein entsprechender Aktivitätsabfall der in ihr enthaltenen Cytochromoxydase parallel geht. Dazu wurde die frostempfindliche Fraktion aus dem Blattextrakt abgetrennt und gesondert untersucht, da auch die frostunempfindliche Fraktion noch hohe Cytochromoxydase-Aktivität aufweist. Diese ist interessanterweise auch nicht durch Gefrieren zu beeinflussen, wogegen die Aktivität der in der frostempfindlichen Fraktion lokalisierten Cytochromoxydase beim Gefrieren — im Gegensatz zum Verhalten der Adenosintriphosphatase — im optischen Test um etwa eine Zehnerpotenz abfällt, in der unspezifischen manometrischen Bestimmung allerdings nur auf etwa die Hälfte reduziert wird.

Sind nun vor dem Gefrieren zugesetzte Zucker in der Lage, die Aktivität des Enzyms im Gefrierexperiment zu beeinflussen? In früheren Untersuchungen war die Schutzwirkung der Zucker gegenüber der Frostfällung ausführlich dargelegt worden (ULLRICH und HEBER 1958, HEBER 1958). Wir hatten aus der ausgeprägten Schutzwirkung im

Fällungsexperiment geschlossen, daß die während des Resistenzerwerbs der Pflanzen beobachtete Zuckeranhäufung mit dem Grad der Frostresistenz in ursächlichem Zusammenhang stehen muß, wenn auch, wegen der komplexen Reaktionsweise lebender Zellen, gewisse Einschränkungen gemacht werden mußten.

Tatsächlich zeigt sich, daß die Aktivität der Cytochromoxydase im Gefrierexperiment der Frostfällung der Proteine weitgehend entspricht, wie aus Abb. 1 hervorgeht. Ohne Zuckerzusatz koaguliert nahezu das

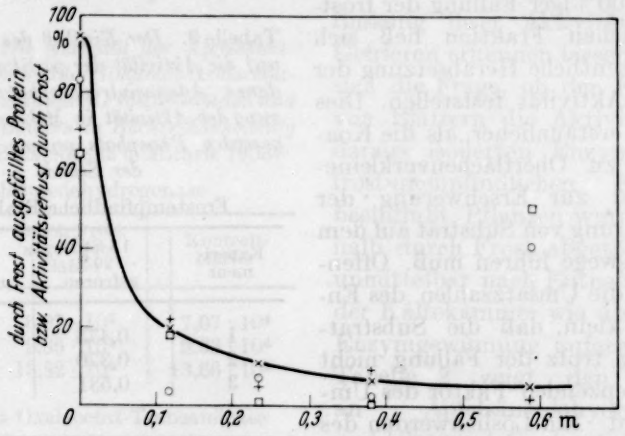



Abb. 1. Der Einfluß von Zuckerzusätzen auf den Aktivitätsverlust der Cytochromoxydase beim Gefrieren im Vergleich zur Höhe der Frostkoagulation. Bestimmung der Cytochromoxydase im optischen Test. × Gravimetrische Bestimmung der Proteinfällung durch Gefrieren; ○ Aktivitätsverlust bei Saccharosezusatz; + Aktivitätsverlust bei Glucosezusatz; □ Aktivitätsverlust bei Raffinosezusatz

gesamte Protein und der Aktivitätsverlust der Cytochromoxydase beträgt etwa 70%. Mit erhöhter Zuckerkonzentration vermindert sich der Wert für die Frostkoagulation ebenso wie der Aktivitätsverlust der Cytochromoxydase. Bei einer Zuckerkonzentration von 0,25 m — einer Konzentration, die durchaus von der lebenden Pflanze bei Resistenzerwerb erreicht wird — bleiben mehr als 90% der Cytochromoxydaseaktivität erhalten, wobei nicht mehr als 10% der Proteine koagulieren. Zucker sind also nicht nur in der Lage, die Frostfällung von Proteinen beim Einfrieren zu verhindern, wie wir das früher schon festgestellt haben, sondern sie erhalten auch die Aktivität gewisser Enzymproteine, die sonst durch die Frostfällung eine ganz erhebliche Aktivitätsverminderung erfahren. Auch wird wieder bestätigt, daß der Grad der Schutzwirkung der einzelnen Zucker nicht von der Gewichtskonzentration der Lösung, sondern von der molaren Konzentration abhängt, wie an anderer Stelle bereits dargelegt worden ist (Ullrich und Heber 1959).

Die verhältnismäßig große Streuung der Werte erklärt sich aus der Schwierigkeit einer genauen Fermentbestimmung im optischen Test in durch Frostfällung getrübtem Medium. Bei hoher Zuckerkonzentration wird die Aktivität des Enzyms offenbar herabgesetzt, so daß dann keine Übereinstimmung mit dem Fällungswert zu erwarten ist. Manometrische Bestimmungen der Cytochromoxydase bestätigen im wesentlichen das Bild, das der optische Test vermittelt, wenn auch die Aktivitätskurven abgeflachter erscheinen, wohl eine Folge des recht unspezifischen manometrischen Testes, der im übrigen auch wesentlich ungenauer arbeitet als die optische Bestimmung.

Der Aktivitätsverlust beim Gefrieren der frostempfindlichen Fraktion ist jedoch nicht irreversibel, sondern läßt sich ebenso wie bei den Enzymen der löslichen Eiweißfraktion, auf die bereits eingegangen wurde, rückgängig machen, wenn das Frostkoagulat intensiv dispergiert wird, wie Tabelle 4 zeigt. Es hat also auch hier keine *Denaturierung* des Enzymproteins durch das Gefrieren stattgefunden.

Tabelle 4. *Die Abhängigkeit der Aktivität der Cytochromoxydase vom Dispergierungszustand des Enzyms. Die Aktivität ist ausgedrückt als die auf die Gewichtseinheit (g) Protein bezogene Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung der Oxydationsreaktion von reduziertem Cytochrom C. Bestimmung im optischen Test*

| Ungefroren Kontrolle | Gefroren, Koagulat nicht dispergiert | Gefroren, Koagulat im Homogenisator dispergiert |
|---|---|---|
| 105 | 16 | 92 |

*b) Gefrierversuche an Blättern.* Neben den in-vitro-Experimenten, bei denen Pflanzenextrakte der Wirkung des Frostes ausgesetzt wurden, war nun weiterhin auch das Verhalten intakter Blätter im Gefrierversuch zu prüfen. Zu diesem Zwecke wurden Pflanzen langsam auf Temperaturen gebracht, die sie nicht lebend ertragen und dann unmittelbar nach der Entnahme aus der Kältekammer noch in gefrorenem Zustande homogenisiert. Auf diese Weise sollten nach Möglichkeit die primären Einflüsse des Ge- und Erfrierens erfaßt werden, die nach Auftauen leicht durch sekundäre Abläufe überdeckt werden könnten. Die Extrakte bzw. frostempfindlichen Proteinfraktionen wurden dann auf ihre Enzymaktivität geprüft.

Der Extrakt von Blättern, die durch Frost abgetötet wurden, hat gegenüber der Kontrolle lediglich etwa 10% der Cytochromoxydase-Aktivität verloren. Ein noch geringerer Unterschied ergibt sich beim Vergleich der Aktivität der frostempfindlichen Fraktionen aus abgetöteten Blättern und Kontrollen. Oben wurde aber schon erwähnt, daß intensive Dispergierung nach Gefrieren die Aktivität der Cytochromoxydase weitgehend wiederherstellt. Es ist also nicht verwunderlich, daß nur geringe Unterschiede im Extrakt und in der frostempfindlichen Fraktion gefunden wurden, da ja die Gewinnung der Fraktionen intensive Dispergierungsvorgänge auch nach dem Gefrieren der Blätter erfordert.

Eine geringe Abnahme der Enzymaktivität im Extrakt der Blätter nach deren Erfrieren besagt demnach leider recht wenig über die Aktivität der Cytochromoxydase im Blatt selbst. Der starke Einfluß des Erfrierens auf die Atmungsabläufe, die unmittelbar nach dem Auftauen der Blätter um mehr als 50% reduziert sind, kann allerdings als Hinweis darauf betrachtet werden, daß die Cytochromoxydase durch das Gefrieren im Blatt selbst stärker beeinträchtigt wurde als aus den in-vitro-Ergebnissen ersichtlich ist.

**3. Fermente der Hillreaktion.** *a) Untersuchungen an Blattextrakten.* Im vorstehenden wurden einige Fermente auf ihr Verhalten gegen Einfrieren geprüft, die relativ stabile Eiweißkörper darstellen, wie die Konstanz der Aktivität in wäßriger Lösung oder ihre Widerstandsfähigkeit gegen Entwässerung beweisen (vgl. die Möglichkeit des Nachweises der Cytochromoxydase in histologischen Schnitten). Nun sollte noch das Verhalten einiger empfindlicher Enzyme untersucht werden. Zu diesen gehören vor allem einige Photosynthesefermente, von denen bekannt ist, daß sie schon in wäßriger Lösung nach kurzer Zeit ihre Aktivität verlieren. Charakteristisch für die empfindlichen Enzyme der Energieübertragung bei der Photosynthese sind ihre partikuläre Bindung und ihr hoher Lipoidgehalt. Beides hat auch ihre Trennung und nähere Charakterisierung bisher verhindert, so daß es hier notwendig ist, am vollständigen Enzymsystem zu arbeiten. Das hat zwar den Nachteil, daß eine für ein bestimmtes Enzym geltende wohldefinierte Aussage nicht möglich ist, dafür aber den Vorteil, daß gleichzeitig in einer einzigen Reaktionskette eine Reihe von Enzymen getestet werden kann. Erschwerend wirkt bei der Untersuchung der Wirkung des Gefrierens, daß der Test längere Zeiträume erfordert. Der erwähnte normale Aktivitätsverlust in wäßriger Lösung macht sich dabei störend bemerkbar, wie aus Tabelle 5 zu ersehen ist. Gleichzeitig aber ist festzustellen, daß die Aktivität der gefrorenen Chloroplasten schneller absinkt als die der ungefrorenen Kontrollen. Es liegt hier ein Einfluß des Ausfrierens vor, und zwar handelt es sich nicht um einen reversiblen Vorgang, wie wir ihn beim Aktivitätsverlust der bisher behandelten Enzyme kennengelernt haben, da eine Dispergierung nicht zur Rückkehr der Aktivität führt. Also ist es statthaft, von einer Denaturierung als Gefrierfolge zu sprechen. Sie ist verschieden von dem Vorgang, der den Aktivitätsverlust der Kontrolle verursacht. Dieser läßt sich durch erniedrigte Temperaturen verlangsamen, jener wird offenbar durch die Entwässerung des Systems beim Gefrieren bedingt. Über die Konzentration der Chloroplasten läßt sich die Geschwindigkeit regeln, mit dem beide, den Aktivitätsverlust verursachenden Vorgänge ablaufen. Friert man Chloroplasten, die etwa 1,5—2 mg Chlorophyll/ml enthalten, ein, so zeigen nach wenigen Stunden die gefrorenen Chloroplasten weit höheren

Tabelle 5. *Empfindlichkeit der Hill-Reaktion von isolierten Chloroplasten und Chloroplastenfragmenten (frostempfindliche Fraktion) gegenüber mehrstündigem Einfrieren in Tris-Puffer. Aktivität in Mikromol $[Fe(CN)_6]^{---}$ Reduktion/mg Chlorophyll je Stunde*[1]

| | Versuchszeit in Stunden | Ungefroren (+2°C) µmol | Gefroren (−20°C) µmol |
|---|---|---|---|
| A. Chloroplasten | 0 | 84,0 | 84,0 |
| | 2½ | 50,0 | 55,0 |
| | 5 | 37,4 | 13,6 |
| B. Frostempfindliche Fraktion | 0 | 66,0 | 66,0 |
| | 4 | 38,4 | 20,0 |
| C. Chloroplasten in Tris-Puffer mit 15% Saccharosezusatz | 0 | 107,0 | 107,0 |
| | 5 | 99,0 | 104,0 |

[1] Wegen der starken Schwankungen in den Zahlenwerten verschiedener Versuche wurde je ein repräsentativer Versuch aus einer Serie zur Darstellung gebracht.

Aktivitätsverlust als die ungefrorenen. Liegt die Chlorophyllkonzentration beim Einfrieren eine Zehnerpotenz unter obigem Wert, so wird die Kontrolle sehr oft einen höheren Aktivitätsverlust als die gefrorene Probe zeigen.

Oben sind zwei Bedingungen für die gute und reproduzierbare Beobachtbarkeit einer Frostinaktivierung der Hill-Reaktion angeführt worden, die eine Besprechung erfordern: eine begrenzte Dauer des Gefrierexperiments und eine bestimmte Eiweißkonzentration. Wir haben bei der Betrachtung unserer in-vitro-Experimente stets die Rückbeziehung auf die Verhältnisse in der Pflanze im Auge zu behalten. Sind nun nicht etwa die Bedingungen des Reagenzglasexperiments zu künstlich, um eine Aussage über das Geschehen in der Pflanze zu erlauben? Die gesamte Dauer des Gefrierexperiments ist durch Altern, d. h. durch den normalen Aktivitätsverlust der Hill-Reaktion der Kontrolle begrenzt. Dieser wird durch enzymatische Inaktivierung oder einfach von der thermodynamischen Instabilität des Enzymsystems bestimmt. In vivo wird er durch die Ordnung des Reaktionssystems oder durch Neusynthese verhindert.

Weiterhin wurde betont, daß sich die Frostinaktivierung der Hill-Reaktion gut nur bei höherer Chlorophyllkonzentration, etwa 1,5—2 mg Chlorophyll bzw. 15—20 mg Eiweiß/ml, beobachten läßt. Wie hoch liegt nun die „Eiweißkonzentration" in der Zelle, wenn man überhaupt diesen Begriff in Anbetracht der hochkomplizierten lebendigen Struktur anwenden kann? Der durchschnittliche Proteingehalt eines ausgewachsenen Blattes beträgt etwa 3% des Frischgewichtes. Dabei nimmt die weitgehend proteinfreie Vacuole den größten Teil des Zellvolumens ein, so daß die Schätzung einer durchschnittlich 10%igen Proteinkonzentration im Plasma nicht zu hoch gegriffen sein dürfte. Diese Konzentration ist aber weit höher als im in-vitro-Experiment.

Es ist also zu erwarten, daß der Frostschaden im Gefrierexperiment im Vergleich mit der Kontrolle weit größer sein würde als beobachtet, wäre es nur möglich, die Alterung der Kontrolle auszuschalten und mit noch höheren Eiweißkonzentrationen zu arbeiten.

Die Alterung der Kontrolle läßt sich tatsächlich weitgehend ausschalten, wenn man zur Eiweißlösung z. B. 5—10% Zucker oder Methanol (Milner u. Mitarb.

1950) zufügt. Doch diese Substanzen wirken auch im Gefrierversuch als Schutzstoffe und verhindern die Frostinaktivierung des Enzyms (Tabelle 5, C).

Man könnte nun auf den Gedanken kommen, daß die oben erwähnten Aktivitätsverluste allein auf Störungen in der ultramikroskopischen *Struktur* des Reaktionssystems der Chloroplasten, bedingt durch „Altern" oder Gefrieren, zurückgehen. Wie Ergebnisse von Gefrierversuchen an der frostempfindlichen Fraktion zeigen, kann das nicht der Fall sein. Diese enthält ja alle gefärbten Bestandteile der Chloroplasten und damit auch die Bestandteile der Hill-Reaktion *desintegriert* (Tabelle 5, B). Nicht nur die Chloroplasten mit ihrer weitgehend intakten Struktur lassen also eine Schädigung des Fermentsystems der Hill-Reaktion durch Frost erkennen, sondern auch die frostempfindliche Fraktion, deren Chloroplastenbestandteile im Verlauf der Aufarbeitung sowohl auf mechanische als auch auf osmotische Weise bis unter die mikroskopische Sichtbarkeitsgrenze desintegriert wurden. Auf das Ineinandergreifen von strukturellen und chemischen Gesichtspunkten bei der Betrachtung des Verhaltens von partikulär gebundenen, in der Zellstruktur verankerten Enzymsystemen wird in der Diskussion noch näher einzugehen sein.

Aus Tabelle 5, B geht hervor, daß auch die Bestandteile der Chloroplasten prinzipiell gleiches Verhalten wie die intakte Struktureinheit zeigen, d.h. bei entsprechender Konzentration an Proteinen der frostempfindlichen Fraktion überwiegt der Aktivitätsverlust durch Gefrieren ganz beträchtlich den Aktivitätsverlust infolge Alterns, ohne daß eine Reaktivierung durch Dispergieren des Koagulates möglich ist.

Es liegen also im Enzymsystem der Hill-Reaktion eindeutig Proteine vor, die durch Gefrieren irreversibel geschädigt, denaturiert werden. Auch bei diesem System sind Zucker in der Lage, stabilisierend zu wirken. Der Stabilisierungseinfluß erstreckt sich auf den Alterungsablauf, wie schon bekannt ist, ebenso aber auch auf eine Schädigung des Systems durch Ausfrieren (Tabelle 5, C).

*b) Gefrierversuche an Blättern.* Um weiterhin zu prüfen, ob die in vitro erhaltenen Ergebnisse auch für die intakte Pflanze und deren Verhalten gegen Frost gelten, wurden, ähnlich wie dies bereits für die Cytochromoxydase beschrieben worden ist, Blätter 15 Std auf $-20^{\circ}$ C eingefroren, wobei Frosttod eintrat. Anschließend wurden unmittelbar nach der Entnahme aus der Kältekammer die Proteine der frostempfindlichen Fraktion bzw. die Chloroplasten aus den Blättern isoliert und die Enzymaktivität geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt. Die Hill-Aktivität von Chloroplasten ist durch das Gefrieren bei frostempfindlichen Pflanzen um fast eine Zehnerpotenz herabgedrückt worden, während frostresistente Pflanzen immerhin noch zwei Drittel ihrer Aktivität einbüßten. Damit können wir in anderem Zu-

Tabelle 6. *Hill-Reaktion von Chloroplasten und Chloroplastenfragmenten (frostempfindliche Fraktion), die aus erfrorenen und ungefrorenen Blättern isoliert wurden*

| Untersuchtes Material | Experiment | Frostresisten der Blätter °C | Hill-Reaktion in µmol $[Fe(CN)_6]^{---}$-Redukt./mg Chlorophyll/Stunde von Chloroplasten oder deren Fragmenten isoliert aus | |
|---|---|---|---|---|
| | | | bei −20 °C erfrorenen Blättern | ungefrorenen Blättern |
| Chloroplasten | 1 | − 6 | 28,0 | 128,0 |
| Chloroplasten | 2 | − 6 | 25,0 | 135,0 |
| Chloroplasten | 3 | − 6 | 21,0 | 153,0 |
| Chloroplasten | 4 | −18 | 48,0 | 120,0 |
| Frostempfindliche Fraktion | 1 | − 6 | 19,0 | 74,0 |
| | 2 | − 6 | 10,8 | 27,0 |
| | 4 | −18 | 43,0 | 43,0 |

sammenhang erhaltene Befunde von FAGER (1952) bestätigen. Bedeutsam erscheint das Verhalten der frostempfindlichen Fraktion: Bei den frostempfindlichen Pflanzen, die einen Zuckergehalt von 4% des Trockengewichtes aufweisen, ist auch hier die Aktivität stark herabgesetzt, während die frostresistenten Pflanzen (Resistenz −18° C) bei einem Zuckergehalt von etwa 20% des Trockengewichts keine Einbuße erkennen lassen. Es ist möglich, daß die erhöhte Zuckerkonzentration hier schützend gewirkt hat, doch bleibt abzuwarten, ob der Befund sich weiterhin immer bestätigen wird.

Es könnte nun die Frage gestellt werden, ob nicht jeder geringe Wasserentzug beim Gefrieren der Blätter die Hill-Reaktion reversibel hemmt und damit eine Frostschädigung vortäuscht. Daß das nicht so ist, zeigt folgender Versuch: Blätter frostresistenter Pflanzen wurden auf −13° C eingefroren, wobei völliges Steiffrieren der Blätter eintrat, ohne daß diese geschädigt wurden. Unmittelbar nach dem Auftauen wurden Chloroplasten isoliert. Deren Aktivität wich nicht von der der ungefrorenen Kontrolle ab. Erst beim Frosttod der Pflanze wird also das Reaktionssystem zerstört, oder umgekehrt, die Zerstörung des Rekationssystems bedingt unter anderem auch den Frosttod der Pflanze. Dieser erfolgt erst bei einem ganz bestimmten Grad von Entwässerung und kann von Schutzstoffen beeinflußt werden.

**4. Fermente der Photosynthese-Phosphorylierung.** *a) Untersuchungen an Blattextrakten.* Nachdem sichergestellt war, daß die Hill-Reaktion frostempfindlich ist, mußte auch das Verhalten jeder weiteren Photosynthese-Reaktion interessieren. Der gebotenen Beschränkung wegen wählten wir die cyclische Photosynthese-Phosphorylierung zur Untersuchung aus. Diese wird, ebenso wie die Hill-Reaktion, von einem Komplex von Enzymen durchgeführt und hat offenbar wenigstens den

ersten Reaktionsschritt, nämlich die Anregung eines Energierezeptors als Photoreaktion, mit der Hill-Reaktion gemeinsam. Die aufgewandte Lichtenergie wird zur Bildung von Adenosintriphosphat aus Adenosindiphosphat und anorganischem Phosphat genutzt (unter anderem Arnon 1959).

In Tabelle 7 sind Ergebnisse von Gefrierversuchen dargestellt, die an Chloroplasten von Spinat und Winterweizen vorgenommen wurden.

Tabelle 7. *Die Empfindlichkeit der cyclischen Photosynthesephosphorylierung von Chloroplasten und Chloroplastenfragmenten (frostempfindliche Fraktion) gegenüber $3^1/_2$stündigem Gefrieren in verschiedenen Medien*

| Experiment | Material | Medium: Puffer mit | Höhe der Photosynthese-Phosphorylierung in µmol Phosphatveresterung/mg Chlorophyll/Stunde | |
|---|---|---|---|---|
| | | | gefroren bei −20 °C | ungefroren bei + 2 °C |
| 1 | Spinat | 2% NaCl | 0,0 | 8,0 |
| 1 | Spinat | 15% Saccharose | 24,0 | 26,3 |
| 2 | Winterweizen | 2% NaCl | 0,5 | 24,2 |
| 3 | Winterweizen | 2% NaCl | 27,0 | 35,5 |
| 4 | Winterweizen | 2% NaCl | 9,5 | 34,4 |
| 5 | Winterweizen | 10% Saccharose | 21,1 | 12,3[1] |
| 6 | Winterweizen | 10% Saccharose | 18,3 | 14,6[1] |

[1] Niedrige Phosphorylierungswerte der Kontrollen lassen sich auf den Alterungsvorgang zurückführen, der bei +2° C schneller als bei −20° C verläuft.

Bei Isolierung der Chloroplasten in NaCl-Puffer und anschließendem Einfrieren wird ihre Aktivität teils ganz zerstört, teils stark herabgesetzt, während Isolierung in Saccharose-Puffer und nachfolgendes Einfrieren auf −20° C kaum zu Aktivitätsverlust führt. Auch hier wird wieder eine Schutzwirkung gerade der Zucker erkennbar. Wie bei der Hill-Reaktion ist auch bei dieser empfindlichen Reaktionskette ein Gegeneinanderwirken zweier Vorgänge zu bemerken: Ein Alterungsvorgang wird durch erniedrigte Temperatur gebremst, während bei tiefen Temperaturen durch die Entwässerung des Systems infolge der Eisbildung Schädigung erfolgt.

*b) Gefrierversuche an Blättern.* Gemäß Tabelle 8 bewirkt auch das Erfrieren von Blättern eine starke Depression der Photosynthese-Phosphorylierung unmittelbar nach der Frosteinwirkung bei isolierten Chloroplasten. Auch hier befinden sich die Ergebnisse in Übereinstimmung mit den Befunden, die bei der Untersuchung der Hill-Reaktion erhalten wurden. Das in-vivo-Experiment bestätigt und verdeutlicht also noch das Bild, das in vitro gewonnen wurde. Der Wasserentzug

infolge Eisbildung beim Gefrieren schädigt das Reaktionssystem der Photophosphorylierung und der Hill-Reaktion. Diese Schädigung kann durch Schutzstoffe unterbunden werden.

Tabelle 8. *Cyclische Photosynthesephosphorylierung von Chloroplasten und Chloroplastenfragmenten (frostempfindliche Fraktion), die aus erfrorenen und ungefrorenen Blättern isoliert wurden*

| Experiment | Material | Photosynthesephosphorylierung in µmol Phosphatveresterung/mg Chlorophyll/Stunde von Chloroplasten oder deren Fragmenten, isoliert aus | |
|---|---|---|---|
| | | bei —20 °C erfrorenen Blättern | ungefrorenen Blättern |
| 1 | Chloroplasten . . . . . | 17,7 | 63,3 |
| 2 | Chloroplasten . . . . . | 10,4 | 42,2 |
| 1 | Frostempfindliche Fraktion . . | 17,6 | 47,0 |
| 2 | Frostempfindliche Fraktion . . | 7,1 | 16,2 |

## Diskussion

Die Frage nach einer Fermentinaktivierung beim Gefrieren ist bereits vor geraumer Zeit aufgegriffen worden, wurde jedoch vorerst negativ beantwortet (LYNEN 1939, 1940). LYNEN führte die Atmungsschädigung beim Gefrieren in flüssiger Luft auf die Zerstörung von Zellmembranen beim Gefrieren zurück, wobei die Reaktionssysteme der Atmung lediglich infolge der nun möglichen Abdiffusion löslicher Cofaktoren ihre Aktivität verlieren sollten. PORTER u. Mitarb. (1953) schlossen sich dieser Auffassung an und dehnten sie auf Zellorganelle aus, deren verminderte Fähigkeit zur Substratoxydation nach dem Gefrieren durch Zusatz von löslichen Cofaktoren wieder hergestellt werden kann. Eine Inaktivierung von Enzymen durch Gefrieren wurde als wenig wahrscheinlich abgelehnt (LYNEN 1939). Jedoch schränkte LYNEN die Folgerungen aus seinen früher erhaltenen Befunden später ein (1944), als er feststellte, daß partikulär gebundene Enzyme oder Enzymsysteme, die lösliche Cofaktoren nicht erfordern, durch Gefrieren ihre Aktivität verlieren können und bejaht nun die Möglichkeit einer Fermentdenaturierung durch Frost. PORTER u. Mitarb. waren nicht in der Lage, alle erhaltenen Befunde auf der Grundlage einer mechanischen Schädigung von Zellorganellen durch das Gefrieren zu erklären. Insbesondere wurde die durch das Gefrieren vollkommen gehemmte oxydative Phosphorylierung und die Oxydation einiger Substrate auch durch Zugabe von Cofaktoren nicht wieder in Gang gebracht. Es ist also nicht recht ersichtlich, worauf sie den Schluß gründen, daß beim Gefrieren von Zellhomogenisaten lediglich mechanische Schädigungen betroffener Zellorganelle eintreten.

Eine Schutzwirkung von Saccharose auf die Enzymaktivität ist schon länger bekannt. So gibt unter anderem Loomis (1950) Schutzeffekte von Saccharose beim Einfrieren von Mitochondriensuspensionen an. Auch Porter u. Mitarb. (1953) berichten, daß Saccharose von einer Konzentration von etwa 4% an aufwärts schützend auf die Substratoxydation ihrer Präparationen wirkt. Diese Werte stehen in guter Übereinstimmung mit unseren Befunden über die Schutzwirkung der Zucker gegenüber der Frostfällung der frostempfindlichen Eiweißfraktion (vgl. Diagramme und Tabellenangaben in Ullrich und Heber 1958, Heber 1958) und bestätigen auch von dieser Seite her die nicht allseits anerkannte Ansicht, daß Zucker bei der Frostresistenz der Pflanzen eine wesentliche Rolle als Schutzstoffe spielen.

Die erhaltenen Befunde sollen nun kurz diskutiert werden:

Bei Blattextrakten tritt eine Schädigung löslicher Enzyme durch das Gefrieren offenbar nicht ein. Die Aktivitätsminderung dieser Enzyme beim Gefrieren von Extrakten, die noch partikuläre, beim Gefrieren koagulierende Proteinkörper enthalten, geht offenbar lediglich auf eine Inklusion der löslichen Enzyme in das Koagulat zurück. Je nach der Natur des fraglichen Enzyms wird bei der Fällung ein mehr oder weniger großer Anteil mitgerissen.

Komplizierter liegen die Verhältnisse bei der Betrachtung partikulär gebundener, in der frostempfindlichen Proteinfraktion lokalisierter Enzyme, die beim Gefrieren ganz unterschiedliche Effekte erkennen lassen. Teilweise ist, wie bei der Adenosintriphosphatase, überhaupt keine Aktivitätsminderung festzustellen, obwohl vollständige Fällung der Proteine eingetreten ist. Im Falle der Cytochromoxydase ist der Aktivitätsverlust reversibel, so daß infolge der Fällung wahrscheinlich nur die Substratzufuhr zum Enzym gehemmt ist. Allerdings ist die Cytochromoxydase ein sehr stabiles Enzym, das Entwässerung verträgt, so daß es erstaunlich wäre, wenn es durch Gefrieren irreversibel geschädigt würde. Anders liegen die Verhältnisse bei empfindlichen Enzymsystemen der Photosynthese, die unter bestimmten (und in der Pflanze auch vorliegenden) Verhältnissen durch Gefrieren offenbar irreversibel geschädigt werden. Der Einwand, daß eine Schädigung dieser Enzymsysteme etwa durch Abdiffusion löslicher Cofaktoren nach mechanischer Schädigung der Struktureinheiten verursacht sein könnte, kann nicht zutreffen. Die betrachteten Enzymreaktionen benötigen nämlich, soweit bekannt, keine löslichen Cofaktoren bzw. sind in der Lage, ohne solche zu arbeiten. Von der Photophosphorylierung wird zwar angegeben, daß ein löslicher Faktor die Aktivität heraufsetzt (Whatley u. Mitarb. 1956, Avron, Jagendorf und Evans 1957), doch stehen dem gegenteilige Befunde gegenüber (Simonis und Fücht-

BAUER 1959, JAGENDORF und AVRON 1958). Eine Schädigung durch das Gefrieren tritt ja nicht nur beim Einfrieren der intakten Struktureinheit ein, nach deren Schädigung Cofaktoren verloren gehen können, sondern auch beim Einfrieren der *desintegrierten* Struktureinheit. Deren einzelne Bestandteile liegen größtenteils jenseits der mikroskopischen Sichtbarkeit, und es kann keinesfalls angenommen werden, daß sie etwa noch von einer semipermeablen Membran umgeben sind, die durch Gefrieren „mechanisch" geschädigt werden könnte, wobei Bestandteile der Enzymkette verloren gehen. Eine mechanische Schädigung hat allerdings stattgefunden, aber bei der Desintegrierung vor dem Einfrieren und hat nicht zum Aktivitätsverlust geführt.

Vergleicht man die Aktivität der Hill-Reaktion isolierter intakter und desintegrierter Chloroplasten (in der frostempfindlichen Fraktion), so fällt auf, daß desintegrierte Chloroplasten in der Regel eine niedrigere Hill-Aktivität besitzen als die intakte Struktureinheit (Tabelle 9). Das könnte seinen Grund darin haben, daß die mechanische Zerstörung des Chloroplasten schon einen Aktivitätsverlust bewirkt, doch muß das keineswegs der Fall sein, da auch Hemmstoffeinflüsse hier eine Rolle spielen könnten: Verschiedene Lipoide wirken hemmend auf die Hill-Reaktion (KROGMANN und JAGENDORF 1959) und die Photophosphorylierung (HEBER 1960). Gerade die frostempfindliche Fraktion, die die desintegrierten Chloroplasten enthält, ist reich an Lipoiden (STOLL und WIEDEMANN 1952).

Tabelle 9. *Vergleich der Aktivität der Fermente der Hill-Reaktion isolierter Chloroplasten und der frostempfindlichen Fraktion, die alle gefärbten Fragmente der Chloroplasten enthält, aus gleichem Pflanzenmaterial*

| Experiment | Aktivität in Mikromol $[Fe(CN)_6]^{---}$ Reduktion/mg Chlorophyll/Stunde | |
|---|---|---|
| | Chloroplasten | frostempfindliche Fraktion |
| 1 | 160,0 | 25,4 |
| 2 | 113,0 | 78,8 |
| 3 | 128,0 | 74,5 |

An dieser Stelle sei nun kurz auf den Begriff der mechanischen Schädigung und der Denaturierung eingegangen.

LEVITT (1956) gibt in seiner Frostresistenztheorie an, daß der Frostschaden der Zelle „mechanisch" bedingt sei. Infolge der durch Eisbildung in der Zelle stattfindenden Entwässerung sollen Dehnungen und Spannungen auftreten, die zu Zerreißungen führen, welche den Frosttod bedingen. Wir haben demgegenüber bereits an anderer Stelle angeführt (ULLRICH und HEBER 1958, HEBER 1958, 1959a), daß die beim Gefrieren auftretenden Fällungen an bereits vorher desintegrierten Zellbestandteilen nicht auf „mechanische" Einflüsse im Levittschen Sinne zurückgeführt werden können. In der vorliegenden Arbeit wird nun gezeigt, daß die Frostfällungen nicht lediglich eine Aggregation von Proteinteilchen ohne physiologische Auswirkungen darstellen, sondern auch Aktivitätsverluste an beteiligten Enzymen und Enzymsystemen bedingen, und zwar sowohl in vitro als auch in vivo.

Was ist nun überhaupt „mechanische" Schädigung und was ist „Denaturierung"? Betrachten wir zuerst den letzteren Begriff. Eine „Denaturierung" ist oftmals schwierig nachzuweisen. Als Kriterien gelten allgemein Löslichkeitsverlust, das Erscheinen vorher nicht nachzuweisender reaktionsfähiger Gruppen oder — nur bei Fermenten leicht nachzuweisen — der Verlust der physiologischen Aktivität. Koagulation und Verlust der physiologischen Aktivität konnten wir aufzeigen. Allerdings sind die Befunde nicht ganz einheitlich, worauf gleich noch zurückzukommen ist.

Für den Begriff der mechanischen Schädigung fehlt bis jetzt, soweit wir sehen, eine verbindliche Definition. Nimmt man an, daß eine mechanische Schädigung lediglich durch Zerreißungen infolge der Frostwirkung bedingt sein soll, so wird diese Annahme keinesfalls mit unseren Befunden bestätigt. Auch ist nicht anzunehmen, daß bestimmte Reaktionen der Zelle, wie etwa die Photosynthese, infolge von Zerreißungen plötzlich gestoppt werden können, wie es bei Frosttod der Fall ist (Heber 1959a). Vielmehr sollte die mechanische Schädigung dann zu einer Fehlleitung und schließlich langsam zu einem Auslaufen der Reaktion führen. Insoweit ist also eine „mechanische" Schädigung abzulehnen.

Andererseits bedingt eine infolge der Eisbildung derart weitgehende Entwässerung empfindlicher Proteinstrukturen, daß Frostfällungen als Folge der Dehydratisierung eintreten, natürlich eine Zerstörung des Strukturgefüges, so daß hier die Denaturierung gewisser Proteine verbunden ist mit der Zerstörung der Struktur. Es wird schließlich eine Frage der Definition sein, ob man die bei einer Entwässerung auftretende Strukturzerstörung als „mechanisch" bedingt betrachten will oder nicht.

Vornehmlich sind in diesem Zusammenhange die Eigenarten der Proteine zu betrachten, die durch Frost ausgefällt werden. Alle koagulierten Proteinkörper besitzen ein so hohes Teilchengewicht, daß sie sich bei 28000 g sedimentieren lassen. Weiter enthalten sie einen hohen Anteil an Lipoiden und Kohlenhydraten. Vor allem der Lipoidanteil scheint für die Anfälligkeit gegenüber einer Entwässerung wesentlich zu sein, wie die leichte Denaturierbarkeit der Fermente der Hill-Reaktion und der Photophosphorylierung zeigt. (Beide Fermentsysteme verlieren bei Entfernen des Lipoidanteils ihre Aktivität, die allerdings unter bestimmten Bedingungen wieder hergestellt werden kann (vgl. Bishop 1959). Demgegenüber wird die Cytochromoxydase durch Gefrieren nicht irreversibel geschädigt, die Adenosintriphosphatase überhaupt nicht, obzwar bei den der frostempfindlichen Fraktion zugehörenden Fermenten zweifellos Löslichkeitsverlust stattfindet. Dieser allein ist also in vorliegendem Falle nicht als Kriterium der Denaturierung zu ver-

wenden. Allerdings würde auch dann, wenn keine Denaturierung, sondern nur eine physikalisch bedingte Aggregation von Proteinteilchen als Frostfolge vorliegt, im hochorganisierten Strukturgefüge der Zelle Schaden entstehen, der zum Tode führt, wenn keine Wiedereinregulierung erfolgen kann. Die in vitro stattfindende Frostfällung der frostempfindlichen Fraktion findet ja ihre Parallele in vivo beim Erfrieren der Zellen, in denen sich leicht mikroskopisch „Frostkoagulate" beobachten lassen.

Die Fällung von Proteinen durch Frost stellt also einen recht komplizierten Vorgang dar, bei dem ein Teil der beteiligten Proteinkörper denaturiert, ein Teil lediglich aggregiert wird, wobei der Effekt für die Zelle in beiden Fällen auf das gleiche hinausführt.

Es wurde bereits erwähnt, daß die in vitro zu beobachtende Frostfällung empfindlicher Proteine ihre Parallele in mikroskopisch leicht zu beobachtenden Koagulationserscheinungen in der erfrorenen Zelle findet. Kann man nun beide Phänomene, die Frostfällung isolierter Proteine im Reagenzglas und die in der Zelle, tatsächlich auf dieselben Ursachen zurückführen? Sind sie letztlich identisch? Die Antwort auf diese Frage muß natürlich von ganz wesentlicher Bedeutung für die Lösung des Frostresistenzproblems sein, da sie entscheidet, ob die in vitro erhaltenen Befunde ohne weiteres auf die Verhältnisse in der Pflanze übertragen werden können. Auf Grund unserer Befunde, insbesondere bei der Untersuchung der Hill-Reaktion und der Photophosphorylierung, sind wir der Ansicht, daß eine Frostfällung im Reagensglas — unter vereinfachten Bedingungen — tatsächlich die gleiche Frostfällung in der Pflanze widerspiegelt. Also sollten die in-vitro-Befunde auf die Verhältnisse in der Pflanze übertragbar sein und gültige Aussagen auch für das lebende Objekt liefern.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft gebührt wieder für die Unterstützung unserer Arbeiten, die dadurch überhaupt erst ermöglicht wurden, unserer besonderer Dank.

## Zusammenfassung

Fermentuntersuchungen an Blättern und Blattextrakten, bei denen ein bestimmter Proteinanteil durch Gefrieren ausgefällt wurde, brachten folgende Ergebnisse:

1. Gewisse lösliche Fermente, die durch Zentrifugieren bei 28000 g nicht sedimentiert werden können, erfahren durch Gefrieren keine Aktivitätsminderung, es sei denn, daß sie bei der Fällung frostempfindlicher Proteine mitgerissen werden.

2. Partikulär gebundene Enzyme oder Enzymsysteme verhalten sich bei einer Frostfällung recht unterschiedlich: Adenosintriphosphatase läßt trotz Einschluß in das Koagulat keine Änderung der Aktivität

erkennen. Cytochromoxydase wird stark gehemmt, jedoch läßt sich die Hemmung durch intensives Dispergieren der Fällung weitgehend rückgängig machen. Lediglich die Fermentsysteme der Hill-Reaktion und der Photophosphorylierung zeigen nach dem Gefrieren irreversible Aktivitätsminderung.

3. Zucker vermögen, je nach Konzentration, die Aktivitätsverluste von empfindlichen Enzymen beim Einfrieren zu verhindern oder weitgehend herabzudrücken.

4. Ebenso wie in eingefrorenen Blattextrakten verhalten sich die untersuchten Fermente in durch Gefrieren abgetöteten und dann unmittelbar aufgearbeiteten Blättern. Es erscheint deshalb eine direkte Übertragung der in vitro erarbeiteten Erkenntnisse auf die Pflanze erlaubt.

## Summary

1. Soluble enzymes which do not sediment on the centrifuge at 28000 g and are not coagulated by freezing, display little or no loss of activity after freezing. Small losses observed in some cases can be explained by inclusion of parts of the soluble protein into the coagulate of the frost-sensitive protein fraction.

2. Particulate enzymes or enzyme systems behave differently. Adenosintriphosphatase shows no change of activity after freezing in spite of inclusion into the coagulate of frostsensitive proteins. Cytochromoxidase looses activity, but activity is restored, at least partially, upon intense dispersion of the coagulate. The enzyme systems of the Hill-reaction and of photophosphorylation show irreversible loss of part of their activity after freezing.

3. Sugars prevent or suppress, according to concentration, losses of activity of frost-sensitive enzymes during freezing.

4. Enzymes obtained immediately after freezing from frost-killed leaves behave in the same way as enzymes in frozen extracts of leaves. It therefore seems probable that results obtained in vitro directly correspond to the events taking place naturally in the plant.

5. Results are discussed in relation to current theories on frost resistence of plants.

## Literatur

Arnon, D. J.: Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxydase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. **24**, 1—15 (1949).

— Conversion of light into chemical energy in photosynthesis. Nature (Lond.) **184**, 10—21 (1959).

Avron, M., A. T. Jagendorf and M. Evans: Photosynthetic phosphorylation in a partially purified system. Biochim. biophys. Acta **26**, 262—269 (1957).

— D. W. Krogmann and A. T. Jagendorf: The relation of photosynthetic phosphorylation to the Hill activity. Biochim. biophys. Acta **30**, 144—153 (1958).

Beisenherz, G., H. J. Boltze, Th. Bücher, R. Czock, K. H. Garbade, E. Meyer-Arendt u. G. Pfleiderer: Diphosphofructo-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase und Pyruvatkinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturforsch. 8b, 555—577 (1953).

Bishop, N. J.: The reactivity of a naturally occuring quinone in photochemical reactions of isolated chloroplasts. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) **45**, 1696—1702 (1959).

Chance, B., and A. C. Maehly: Catalases and Peroxidases. In: Methods in Enzymology, vol. II, p. 764—772. New York 1955.

Fager, E. W.: Photochemical carbon dioxide fixation by cell-free leaf macerates. Arch. Biochim. **37**, 5—14 (1952).

Fiske, C. H., and Y. Subbarow: Phosphocreatine. J. biol. Chem. **81**, 629—679 (1929).

Heber, U.: Zur Frage der Lokalisation von löslichen Zuckern in der Pflanzenzelle. Ber. dtsch. Bot. Ges. **70**, 371—382 (1957).

— Ursachen der Frostrestistenz bei Winterweizen. I. Die Bedeutung der Zucker für die Frostresistenz. Planta (Berl.) **52**, 144—172 (1958).

— Beziehungen zwischen der Größe von Chloroplasten und ihrem Gehalt an löslichen Eiweißen und Zuckern im Zusammenhang mit dem Frostresistenzproblem. Protoplasma **51**, 284—298 (1959).

— Ursachen der Frostresistenz bei Winterweizen. III. Die Bedeutung von Proteinen für die Frostresistenz. Planta (Berl.) **54**, 34—67 (1959a).

— Vergleichende Untersuchungen an Chloroplasten, die durch Isolierungsoperationen in nicht-wäßrigem und in wäßrigem Milieu erhalten wurden. Z. Naturforsch. **15b**, 100—109 (1960).

— Ein Hemmstoff der Photosynthese-Phosphorylierung in Chloroplasten. Z. Naturforsch. **15b**, 653—656 (1959).

Jagendorf, A. T., and M. Avron: Cofactors and rates of photosynthetic phosphorylation by spinach chloroplasts. J. biol. Chem. **231**, 277—290 (1958).

Kapeller-Adler, R.: Histaminase. Biochem. J. **44**, 70—77 (1949).

Krogmann, D. W., and A. T. Jagendorf: Inhibition of the Hill reaction by fatty acids and metal chelating agents. Arch. Biochem. **80**, 421—430 (1959).

La Due, J. S., F. Wroblewski and A. Karmen: Serum glutamatic-oxalacetic transaminase activity in human acute transmural myocardial infarctions. Science **120**, 497—499 (1954).

Levitt, J.: The Hardiness of Plants. New York 1956.

Loomis, W. F.: Stabilisation of mitochondria by vitrification. Arch. Biochem. **26**, 355—357 (1950).

Lynen, F.: Über den Stoffwechsel der Hefe nach dem Einfrieren in flüssiger Luft. Justus Liebigs Ann. Chem. **539**, 1—39 (1939).

— Über die Atmung tierischer Gewebe nach dem Einfrieren in flüssiger Luft. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **264**, 146—152 (1940).

— Über den Stoffwechsel tierischer Gewebe nach dem Einfrieren in flüssiger Luft. II. Versuche an Nierenextrakten. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **281**, 83 (1944).

Mehler, A. H., A. Kornberg, S. Grisolia and S. Ochoa: Enzymic mechanism of oxidation — reductions between malate or isocitrate and pyruvate. J. biol. Chem. **174**, 961—977 (1948).

Milner, H. W., C. S. French, M. L. G. Koenig and N. S. Lawrence: Measurement and stabilisation of activity of chloroplast material. Arch. Biochem. **28**, 193—200 (1950).

Porter, V. S., N. P. Denning, R. C. Wright and E. M. Scotts: Effects of freezing on particulate enzymes of rat liver. J. biol. Chem. **205**, 883—891 (1953).

Ruhland, W.: Zur chemischen Organisation der Zelle. Biol. Zbl. **33**, 337—351 (1913).

Simonis, W., u. W. Füchtbauer: Beobachtungen zur Photosynthese-Phosphorylierung isolierter Chloroplasten. Planta (Berl.) **54**, 95—106 (1959).

Slein, M. W.: Phosphohexoseisomerases from muscle. In: Methods in Enzymology, vol. I, p. 299—306. New York 1955.

Smith, L.: Some oxidative enzymes of baker's yeast. Arch. Biochem. **50**, 285—298 (1954).

Stoll, A., u. E. Wiedemann: Chlorophyll. Fortschr. chem. Forsch. **2**, 538—608 (1952).

Ullrich, H., u. U. Heber: Über das Denaturieren pflanzlicher Eiweiße durch Ausfrieren und seine Verhinderung. Planta (Berl.) **51**, 399—413 (1958).

Whatley, F. R., M. B. Allen, L. L. Rosenberg, J. B. Capindale and D. J. Arnon: Photosynthesis by isolated chloroplasts. V. Phosphorylation and carbon dioxide fixation by broken chloroplasts. Biochim. biophys. Acta **20**, 462—468 (1956).

Prof. Dr. H. Ullrich und Dr. U. Heber, Institut für landwirtschaftliche Botanik, Bonn, Meckenheimer Allee 176

Planta 57, 391—401 (1961)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Bonn

# WACHSTUMSINDUKTION UND WUCHSSTOFFMETABOLISMUS IM WEIZENKOLEOPTILZYLINDER

## IV. DIE IDENTIFIZIERUNG EINES STOFFWECHSELPRODUKTES DER NAPHTHYL-1-ESSIGSÄURE, DAS MÖGLICHERWEISE BEZIEHUNG ZUR WACHSTUMSFÖRDERUNG BESITZT*

Von

HANS-DIETER KLÄMBT

Mit 3 Textabbildungen

*(Eingegangen am 12. Juli 1961)*

Schon in den vorangegangenen Arbeiten (KLÄMBT 1961 a, b, c) habe ich darauf hingewiesen, daß es zum Verständnis der Wirkungsweise der Streckungswuchsstoffe erforderlich ist, die Reaktionsprodukte zu identifizieren, die in den Testorganen während entsprechender Inkubation gebildet werden. In der vorletzten Arbeit (1960 b) konnte ich für die Wuchsstoffsäuren das Auftreten von Glucose-Estern nachweisen, die jedoch auch Nichtwuchsstoffe wie Anthranilsäure (TABONE u. Mitarb. 1954) und Benzoesäure (BS) (KLÄMBT 1961 b) in der Pflanze ergeben. Aus diesem Grund wurden die Glucose-Ester zunächst als Entgiftungsprodukte angesehen. Ob sie als Wuchsstoffsäure-Ester noch eine zusätzliche Bedeutung besitzen, habe ich in der letzten Arbeit in Zweifel gezogen. Es ist aber wahrscheinlich, daß die Wuchsstoff-Glucose-Ester neben der primären Entgiftungsfunktion später auch eine gewisse Depotfunktion erfüllen, ähnlich wie ich sie für die Indol-3-acetylasparaginsäure (IAAS) (KLÄMBT 1961 a) aufzeigen konnte. Ein bedeutsamer Unterschied besteht dabei jedoch zwischen der energiearmen Wuchsstoffbindung des Esters und der energiereichen Bindung des Säure-Amid-Konjugats.

Diese bekannten Reaktionsprodukte werden also sowohl von den Wuchsstoffsäuren als auch von den Nichtwuchsstoffen gebildet. In der letzten Arbeit (KLÄMBT 1961 c) konnte ich eine Anzahl von Substanzen herausstellen, die offenbar nur von den Wuchsstoffen Naphthyl-1-essigsäure (NES), Indol-3-essigsäure (IES) und teilweise 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), nicht aber von BS gebildet werden. Es liegt nahe, bei diesen Substanzen eine stoffliche Beziehung zur Wachstumsförderung zu sehen. Das ist auch der Grund, weshalb diese Reaktionsprodukte

* Herrn Prof. Dr. WALTER SCHUMACHER zu seinem 60. Geburtstag in Verehrung gewidmet.

besonderes Interesse beanspruchen. Eine der Substanzen, die mengenmäßig am stärksten auftritt — $NY_1$ —, war der Analyse am leichtesten zugänglich.

## Material und Methoden

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung des $Y_1$-Derivates der NES benutzte ich Weizenkoleoptilzylinder (WKZ) der Weizensorte „Carsten VI". Die Anzucht und Aufarbeitung erfolgte nach der früher beschriebenen Methode (KLÄMBT 1961a). Die WKZ wurden 22 Std in $6 \times 10^{-4}$ m NES Lösungen inkubiert, und anschließend wurden je 5 WKZ im Abstand von je 5 mm auf die Startlinie eines Chromatogramms aufgedrückt. Danach wurde mit Butanol: Ameisensäure: Wasser chromatographiert. Die $6 \times 10^{-4}$ m Wuchsstofflösung setzte sich aus $^1/_{10}$ radioaktiver und $^9/_{10}$ nichtmarkierter Wuchsstoffsäure zusammen. Es wurde die gleiche radioaktiv markierte NES wie in der letzten Arbeit (KLÄMBT 1961c) verwendet. Die um eine Zehnerpotenz verminderte Gesamtaktivität genügte noch, um nach zwölftägiger Exposition brauchbare Autoradiogramme zu erhalten. Mit diesen konnte ich die Zonen auf den Chromatogrammen ermitteln, die das $Y_1$-Derivat enthielten. Sie wurden ausgeschnitten und auf neues Chromatographierpapier genäht. Als zweites Lösungsmittel kam nun Isopropanol: $NH_4OH$: Wasser zur Anwendung. Hierzu konnten auch frische Ansätze des Lösungsmittels benutzt werden, da das $Y_1$-Derivat der NES durch konzentriertes $NH_4OH$ nicht gespalten wird (KLÄMBT 1961c). Die Chromatogramme wurden danach erneut 12 Tage gegen Röntgenpapier exponiert und der auf dem Autoradiogramm ermittelte $Y_1$-Fleck bzw. -Streifen aus dem Chromatogramm herausgeschnitten und mit Wasser eluiert. Durch diese zweifache Chromatographie bekam ich die $Y_1$-Substanz hinreichend rein. Die Eluate enthielten keine Verunreinigungen durch Kohlenhydrate, Carbonsäuren oder Aminosäuren. Sie wurden im Vakuum bei 30° C zur Trockne eingeengt und im Exsiccator über $CaCl_2$ bei $+5°$ C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Auf diese Art wurden 10000 WKZ nach NES-Inkubation aufgearbeitet, was einem Frischgewicht von etwa 30—35 g WKZ-Gewebe entspricht. Sie ergaben eine $NY_1$-Ausbeute von insgesamt etwa $2 \times 10^{-5}$ M NES-Äquivalent, d.h., das $NY_1$-Präparat enthielt etwa $2 \times 10^{-5}$ M NES (= 3,62 mg NES) in gebundener Form. Versuche, die Substanz kristallin zu erhalten, wurden bisher nicht unternommen. Zur Aufklärung der chemischen Struktur wurde $NY_1$ verschiedenen Hydrolysen unterworfen, die in den Ergebnissen beschrieben werden.

## Ergebnisse

Das Autoradiogramm der Abb. 1 veranschaulicht Lage und Konzentrationsverhältnisse der NES-Reaktionsprodukte, die nach zweidimensionaler Chromatographie von 10 am Startfleck aufgedrückten WKZ nach entsprechender Inkubation auftreten. In der letzten Arbeit konnte ich zeigen, daß die $X_1$—$X_4$-Derivate der BS, IES und NES durch konzentriertes $NH_4OH$ bei Zimmertemperatur auf dem Chromatographierpapier hydrolysierbar sind, während $IY_1$ und $NY_1$ unverändert erhalten bleiben. Dieser Versuch wurde mit dem reinen $NY_1$-Präparat wiederholt und ergab das gleiche Ergebnis.

Wenn auch die Löslichkeitsverhältnisse des $IY_1$ und $NY_1$ in Äthyläther, Äthylacetat und n-Butanol sich von jenen der IAAS und NAAS

unterscheiden (KLÄMBT 1961c), so liegt doch durch die Ähnlichkeit der $R_f$-Werte beider Derivate der IES und NES die Vermutung nahe, daß es sich bei den $Y_1$-Derivaten um entsprechende Konjugationsprodukte zwischen Wuchsstoffsäure und Aminosäure bzw. Peptide handeln könnte. Um diese Annahme zu prüfen, wurde analog zur Eiweißhydrolyse eine Probe von $NY_1$ in 20%iger HCl im zugeschmolzenen Rohr 24 Std bei

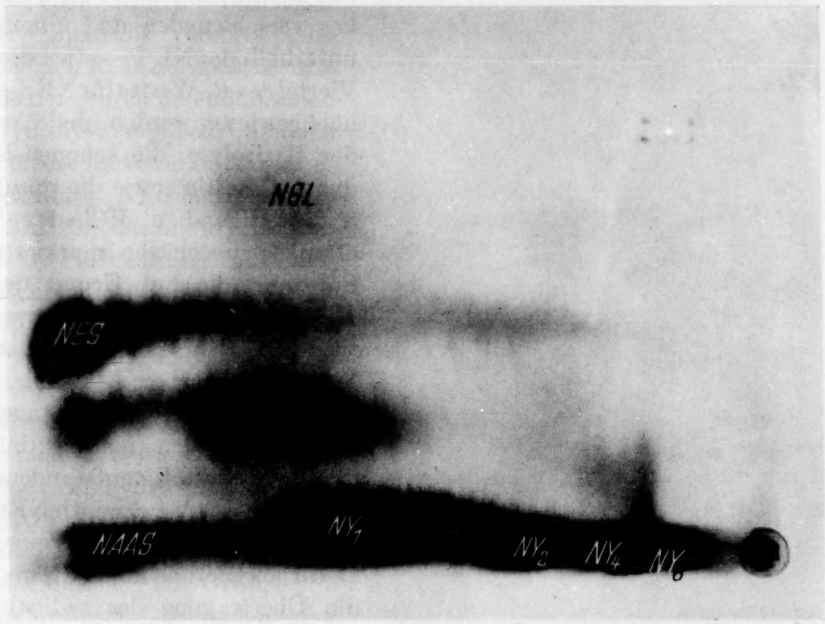



Abb. 1. Autoradiogramm eines zweidimensionalen Chromatogramms von je 10 am Startfleck aufgedrückten WKZ, die 22 Std in $^{14}$C-markierter NES ($6 \times 10^{-5}$ m) inkubiert waren. 1. Dimension (horizontal): Butanol:Ameisensäure:Wasser. 2. Dimension: Isopropanol: $NH_4OH$:Wasser. *S* Startfleck

100° C hydrolysiert. Nach Vakuumtrocknung über KOH und anschließendem Lösen des noch geringfügig sauren Rückstandes mit wenig Wasser wurde chromatographiert und mit Ninhydrin entwickelt. Es ließ sich kein ninhydrinpositiver Fleck nachweisen. Auf Grund dieses Ergebnisses konnte ich die eventuelle Beteiligung von Aminosäuren am Aufbau des $NY_1$-Moleküls ausschließen.

In Parallelansätzen ist dann $NY_1$ mit n HCl 1 Std bei 100° C im geschlossenen Rohr und mit n NaOH 1 Std bei 100° C im nicht zugeschmolzenen Gefäß hydrolysiert worden. Eine entsprechende Probe von $NY_1$ wurde mit Emulsin $3^1/_2$ Std bei 32° C inkubiert. Das NaOH-Hydrolysat wurde anschließend nach Abkühlung mit HCl angesäuert, um die Na-Ionen aus den Na-Salzen der NES und eventuell anderer auftretender Säuren zu verdrängen, die bei der Chromatographie in

Isopropanol:$NH_4OH$:Wasser niedrigere $R_f$-Werte besitzen als die entsprechenden undissoziierten Säuren bzw. ihre $NH_4$-Salze (KLÄMBT 1959a). Nach Chromatographie der Hydrolysate in Isopropanol:$NH_4OH$:Wasser und anschließender Exposition gegen Röntgenpapier wurde ein für jede Hydrolyse gleiches Ergebnis erhalten (Abb. 2). NES und $NY_1$ dienten als Vergleichssubstanzen. Die Radioaktivität war jeweils aus der Position des $NY_1$-Flekkes verschwunden und konnte unterhalb der NES — etwa drei Viertel des $R_f$-Wertes für NES — nachgewiesen werden. Jede Art der Hydrolyse, die schonenste durch Emulsin sowie die durch n NaOH und n HCl, ergab offenbar die gleiche markierte Substanz, die auf Grund des $R_f$-Wertes mit NES nicht identisch ist. NES wurde in den Versuchen carboxyl-$^{14}C$ markiert verwendet, so daß angenommen werden mußte, daß die hydrolytisch entstandene radioaktive Substanz noch NES enthielt. Die Möglichkeit einer Decarboxylierung der NES und die Übertragung des radioaktiven C-Atoms auf andere Verbindungen konnte als sehr unwahrscheinlich außer acht gelassen werden.

Abb. 2. Autoradiogramm eines Chromatogramms (Lösungsmittel: Isopropanol:$NH_4OH$:Wasser). Von links nach rechts: 1. $NY_1$ Vergleichssubstanz; 2. $NY_1$ mit Emulsin $3^1/_2$ Std inkubiert; 3. NES Vergleichssubstanz; 4. $NY_1$ mit n HCl 1 Std bei 100° C hydrolysiert

Durch die Emulsinspaltung war gezeigt, daß eine $\beta$-glykosidische Bindung vorliegen mußte. Die Entwicklung der Chromatogramme mit Anilin-Phthalsäure war auch positiv, und der $R_f$-Wert-Vergleich mit einigen Kohlenhydraten in verschiedenen Lösungsmittelsystemen ergab eindeutig den Nachweis der Glucose als Hydrolysenprodukt. Glucose konnte als einziges Kohlenhydrat ebenfalls nach n NaOH- und n HCl-Hydrolyse nachgewiesen werden. Aus den Hydrolysenergebnissen der Glucose-Ester (KLÄMBT 1961 b) ist bekannt, daß diese Ester durch konz. $NH_4OH$ quantitativ spaltbar sind. Eine Esterbindung kam folglich für die $NY_1$-Substanz nicht in Frage. Berücksichtigt man einerseits ihren recht geringen $R_f$-Wert in Isopropanol:$NH_4OH$:Wasser und andererseits ihre Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, so mußte für

$NY_1$ eine saure und relativ hydrophile Substanz gefordert werden. Die Hydrophilie ist durch die Glucose gegeben, während die saure Natur möglicherweise von dem freien Säurerest der NES stammen konnte. Die glykosidische Bindung mußte zwischen dem Halbacetal der Glucose in $\beta$-Stellung und einer phenolischen Hydroxylgruppe vorliegen, weil die fermentative Spaltung von $NY_1$ die gleichen Reaktionspartner wie die der sauren und alkalischen Hydrolyse ergaben, nämlich Glucose und eine zunächst unbekannte NES-haltige Substanz. Die daraufhin angewendete Farbreaktion mit diazotierter Sulfanilsäure (DSS) ergab für das radioaktive Hydrolysenprodukt eine positive, rotviolett bis grauviolette Farbreaktion. Damit war zunächst bewiesen, daß $NY_1$ eine ringhydroxylierte NES (HO-NES) enthält. Ein zusätzlicher Beweis, daß die phenolische OH-Gruppe $\beta$-glykosidisch gebunden ist, kann darin gesehen werden, daß $NY_1$ mit DSS nur nach starker Erwärmung eine schwache Farbreaktion ergibt. Diese ist auf Spuren von HCl im DSS-Präparat zurückzuführen, die bei Erwärmung $NY_1$ teilweise hydrolysieren.

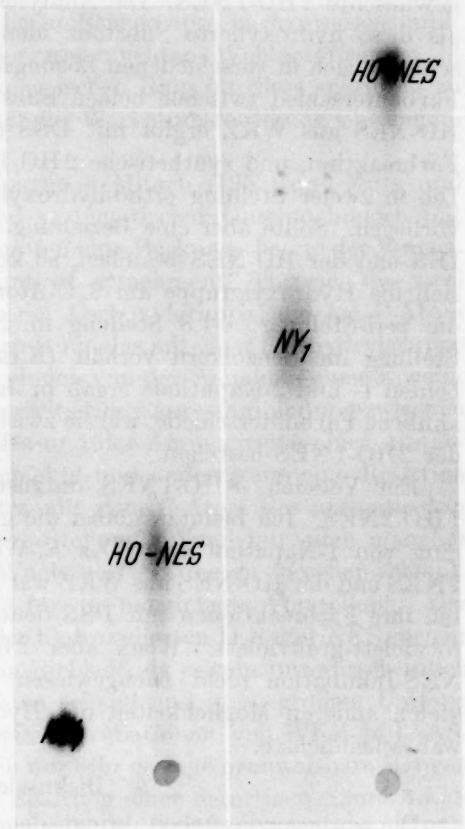



Abb. 3a u. b. Autoradiogramme von zwei Chromatogrammen mit $NY_1$ vor und nach Emulsin-Inkubation. a Lösungsmittel: Isopropanol: $NH_4OH$: Wasser; b Lösungsmittel: Butanol: Ameisensäure: Wasser

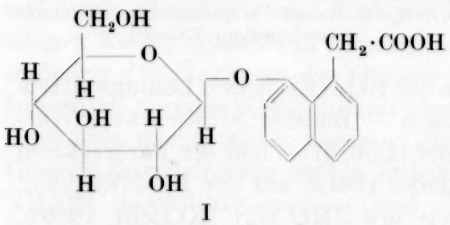
Aus dem Vergleich der $R_f$-Werte der HO-NES in den Lösungsmitteln meiner zweidimensionalen Trennungen — Butanol: Ameisensäure: Wasser und Isopropanol: $NH_4OH$: Wasser (Abb. 3) — und der Farbreaktion erweist sich die NZ-Substanz (Klämbt 1961c) mit der HO-NES identisch. Damit besitzt der Nachweis der 2HO-IES (Klämbt 1959b, 1961a, c) nach IES-Inkubationen eine Parallele im Auftreten von HO-NES nach NES-Inkubation. Die Frage nach der Stellung der Hydroxylgruppe am Ringsystem war am einfachsten über den Vergleich mit

synthetischen hydroxylierten Naphthylessigsäuren zu lösen. Dabei benutzte ich die Darstellungsmethode von GRIEHL (1947). Die Prüfung der 2HO-1NES lag zunächst am nächsten. In Gegenwart von Essigsäureanhydrid dehydrierte ich $\beta$-Naphthol mit $KMnO_4$ und erhielt die gewünschte 2HO-1NES. Die Analysensubstanz ließ sich jedoch nicht als diese hydroxylierte Substanz identifizieren. Die $R_f$-Werte unterschieden sich in verschiedenen Lösungsmitteln geringfügig, während ein Farbunterschied zwischen beiden Substanzen deutlich hervortrat. Die HO-NES aus WKZ ergibt mit DSS eine rotviolette bis grauviolette Farbreaktion, und synthetische 2HO-1NES färbt sich gelb-orange an. Die in zweier Stellung ortho-hydroxylierte 1NES kann folglich nicht vorliegen. Sollte aber eine Beziehung zwischen der Bildung der 2HO-IES und der HO-NES bestehen, so konnte angenommen werden, daß sich die Hydroxylgruppe am 8. C-Atom des Naphthalins befindet, da die peri-Stellung = 1,8 Stellung im Naphthalin sich wie eine ortho-Stellung im Benzolkern verhält (KARRER 1958). Ein Vergleich der beiden 1- und 2-Naphthole ergab in ihrer Farbreaktion mit DSS ganz ähnliche Farbunterschiede, wie sie zwischen der HO-NES aus WKZ und der 2HO-1NES bestehen.

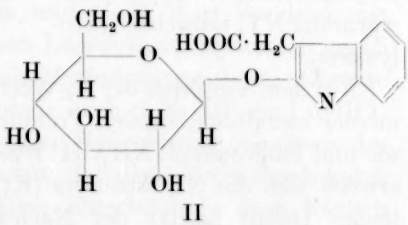
Ein Versuch, 8HO-1NES darzustellen, führte offenbar nur zu 1HO-2NES. Ich benutzte dabei die gleiche Darstellungsmethode und ging von 1-Naphthol aus. Der $R_f$-Wert-Unterschied zwischen 1HO-2NES und der HO-NES aus WKZ war nur geringfügig, jedoch differierten ihre Farbreaktionen mit DSS deutlich zwischen rot-rotviolett und rotviolett-grauviolett. Wenn aber 2HO-1NES in der Pflanze nach NES-Inkubation nicht nachgewiesen werden kann, so bleibt neben vielen anderen Möglichkeiten die Hydroxylierung am 8. C-Atom die wahrscheinlichste.

## Diskussion

Die vorliegende Arbeit bringt den Nachweis einer hydroxylierten Naphthylessigsäure (HO-NES) — höchstwahrscheinlich 8HO-1NES — und ihrer glykosidischen Bindung mit Glucose (I).




I




II

Schon früher habe ich die 2-Hydroxy-Indol-3-essigsäure (KLÄMBT 1959b) beschrieben, für die das entsprechende Glykosid (II) gefordert

werden muß. Das Vorkommen dieser Glykoside, die eine Oxydation der Wuchsstoffmoleküle am aromatischen Ring zur Voraussetzung haben, eröffnet eine Fülle von Reaktionsmöglichkeiten im Zellstoffwechsel. Nachdem ich zeigen konnte (KLÄMBT 1961c), daß Benzoesäure offenbar kein entsprechendes Derivat bildet, und bisher auch der Versuch, Salicylsäure oder eine andere hydroxylierte Benzoesäure nachzuweisen, mißlang, scheint die Oxydation der untersuchten Wuchsstoffsäuren in ortho- bzw. peri-Stellung am aromatischen Ring für diese spezifisch zu sein. Diese Reaktion könnte daher zur Wachstumsförderung eine engere Beziehung besitzen.

HANSCH und MUIR (1950), FOSTER u. Mitarb. (1952) und MUIR und HANSCH (1953) haben auf Grund systematischer Untersuchungen mit synthetischen Streckungswuchsstoffen eine Wirkungstheorie der Wuchsstoffe formuliert, die „two point of attachment"-Theorie, die zwei reaktive Bindungen fordert: an der Carboxylgruppe und am C-Atom in ortho-Stellung am aromatischen Ring, das mit einer Sulfhydrylgruppe zur Reaktion kommen soll. Sie gingen von der Annahme einer Eiweißbindung aus und vermuteten einerseits eine Säureamidbindung zwischen der Säuregruppe des Wuchsstoffes und der Aminogruppe einer Aminosäure am Eiweiß- oder Peptidmolekül und andererseits eine Reaktion der SH-Gruppe des Cysteinrestes mit dem C-Atom des aromatischen Ringes des Wuchsstoffes in ortho-Stellung. Wenn mir auch manches für die Zweipunkt-Theorie der Wuchsstoffwirkung zu sprechen scheint, so habe ich doch keine Beweise für die entwickelte Vorstellung. Der Nachweis der $Y_1$-Derivate und der hydroxylierten IES und NES spricht gegen die geforderte Reaktionsmöglichkeit, da es sehr unwahrscheinlich ist, daß Säure-Amid-Bindungen so schnell und in so großem Umfang wieder gespalten werden können. Inkubationen von WKZ in IAAS-Lösungen (KLÄMBT 1961a) zeigen nur sehr geringe nachweisbare Mengen von IES in den WKZ, die aus Spaltung einer derartigen Säure-Amid-Bindung stammen müssen. Für die von FOSTER u. Mitarb. (1952) und von MUIR und HANSCH (1953) geforderte Reaktion des C-Atoms in ortho-Stellung am aromatischen Ring scheint der Nachweis des Glucosids der HO-NES — Formel I — zu sprechen. In Diskussionen über die Vorstellungen der Wuchsstoffwirkung (VELDSTRA 1953, AUDUS 1959) wurde dieser Zweipunkt-Theorie heftig widersprochen, da einige diortho substituierte aromatische Säuren Wuchsstoffcharakter besitzen. Dieser Theorie wurden zwei weitere gegenübergestellt: 1. die Dreipunkt-Theorie von WAIN (1949) und SMITH und WAIN (1952) und 2. die Theorie von VELDSTRA (1944, 1953), die ein ausgeglichenes Verhältnis des hydrophilen aliphatischen und des lipophilen aromatischen Anteils fordert. Der polare hydrophile Teil soll sich aus der Ebene des aromatischen Ringes herausheben. Die Dreipunkt-Theorie ist allgemeiner gefaßt. Sie

verlangt neben der Carboxylgruppe ein ungesättigtes Ringsystem und ein räumlich zwischen beiden gelagertes α-Wasserstoffatom. Es ist zu früh, diese Theorien gegeneinander abzuwägen, da das Untersuchungsmaterial zu klein ist und die Diskussion ins rein Spekulative übergehen müßte. Die vorliegenden Versuchsergebnisse führten mich zu der Annahme, daß das reaktive C-Atom im aromatischen Ring zwar nicht unbedingt in ortho-Stellung, zumindest aber in einer räumlichen Beziehung zur Carboxylgruppe stehen muß. Für Wuchsstoffe mit der Essigsäure als aliphatischem Rest ist aus diesen Gründen sicher das C-Atom in ortho- bzw. peri-Stellung für die Reaktion notwendig. Für substituierte Benzoesäuren kommen dafür möglicherweise nur die in meta- oder para-Stellung in Frage. Sollte sich diese Anschauung durch das Experiment bestätigen lassen, so würde die Vorstellung von VELDSTRA mit einer allgemeiner gefaßten Zweipunkt-Theorie zusammenfließen.

Eine Möglichkeit, die Oxydation des aromatischen Ringes zu deuten, habe ich bereits früher (KLÄMBT 1959b) im Zusammenhang mit dem Nachweis der 2HO-IES erwähnt. Sie verläuft entweder als β-Oxydation, wobei fraglich ist, ob eine Wasseranlagerung an Ringdoppelbindungen überhaupt möglich ist, oder über spezielle Hydroxylasen. Während der erste Oxydationsweg 2H über DPN und somit 3ATP ergeben würde, wäre für den letzten TPNH als H-Donator notwendig, so daß man dabei keinen Energiegewinn erhalten würde. MARRÉ und FORTI (1958) konnten nach Wuchsstoffgaben einen Anstieg von ~ P nachweisen, das im wesentlichen auf eine Vermehrung von ATP zurückzugehen scheint. Nach 30 min Inkubation erreicht es ein Maximum. Ob diese Daten in der Ringoxydation der Wuchsstoffmoleküle ihre Ursache haben, muß experimentell geprüft werden.

In dieser Oxydation ist freilich nur eine Vorbereitung der Wuchsstoffe für ihre Wirkung zu sehen. Ob die Wuchsstoff-Glucoside — Formel I und II — die wirkungsaktiven Substanzen oder nur Teile davon darstellen, ist heute noch nicht entschieden. Es wäre aber auch denkbar, daß es sich um Entgiftungsprodukte analog zum Glucose-Ester der Wuchsstoffe handelt. Offenbar sind höher molekulare wuchsstoffenthaltende Substanzen — $Y_2$ bis $Y_7$ — vorhanden, während entsprechende Verbindungen der Benzoesäure (BS) fehlen. Man kann also annehmen, daß die Wuchsstoff-Glucoside entweder nur Teilmoleküle eines letzlich wirksamen Stoffes darstellen oder Entgiftungsfunktionen besitzen. Für diese Entgiftung müßte allerdings gefordert werden, daß die freie Säuregruppe der Wuchsstoffe im $Y_1$-Derivat abgebunden wird. Sie wäre durch eine Esterbindung mit einer Hydroxylgruppe der Glucose möglich. Es ist aber auch denkbar, daß die Glucoside eine Rolle in der Bereitstellung der Glucose als Zellwandmaterial besitzen. Eine solche Möglichkeit habe ich schon einmal für die Wuchsstoff-Glucose-Ester diskutiert (KLÄMBT 1961 b, c).

Das Auftreten der $Y_1$-Derivate stimmt mit dem der Asparaginsäure-Konjugate überein. Man kann daher annehmen, daß die Bildung der $Y_1$-Derivate ähnlich wie die der Asparaginsäure-Konjugate energieabhängig ist. Mit zunehmender Erhöhung der Wuchsstoffkonzentration über jene, die eine maximale Förderung des WKZ-Wachstums auslöst, wird das Wachstum vermindert und schließlich völlig gehemmt. Damit geht die Abnahme der $Y_1$-Substanz parallel und stimmt mit der der IAAS völlig überein (KLÄMBT 1961a). Das würde bedeuten, daß die Ringoxydation des Wuchsstoffmoleküls möglicherweise in seiner Bindung an Co-Enzym A erfolgt. Die Bildung der Glucose-Ester, die natürlich ebenfalls in diesem Bereich abnimmt, erfährt jedoch keine derartige Depression. Dies spricht für die energieärmere Esterbindung.

Kürzlich hat ENGELBRECHT (1961) berichtet, daß IES auf Tabakblättern ähnlich wie Kinetin wirkt, d.h. sie erhöht die Akkumulationsfähigkeit der Blätter für Aminosäuren, Kohlenhydraten usw. (vgl. auch YAKUSCHKINA u. Mitarb. 1956), und daraus resultiert eine Blattverjüngung (MOTHES 1960). ENGELBRECHT konnte darüber hinaus zeigen, daß Stoffwechselprodukte der IES, die während der Behandlung im Tabakblatt entstehen, eine zum Teil stärkere Wirkung besitzen als IES selbst. Sie chromatographierte die Extrakte in Isopropanol:$NH_4OH$: Wasser und erhielt drei Fraktionen. Jene mit der bemerkenswert hohen Aktivität enthält nach der Lage auf dem Chromatogramm IAAS, $IY_1$ und alle übrigen, bisher nicht identifizierten Y-Derivate. Es ist wahrscheinlich, daß die Zellstreckung und die Zellerhaltung gleiche oder doch sehr ähnliche, wirkungsaktive Stoffe benötigen, da wohl beide eine Akkumulationsfähigkeit zur Voraussetzung haben.

## Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit bemüht sich um die Identifizierung eines Reaktionsproduktes der Naphthyl-1-essigsäure (NES) — $NY_1$ — das in Weizenkoleoptilzylindern (WKZ) nach NES Inkubation gebildet wird. Ein entsprechendes Reaktionsprodukt der Benzoesäure konnte nicht nachgewiesen werden (KLÄMBT 1961c).

1. Das $Y_1$-Derivat der NES stellt ein Glucosid dar, das sich $\beta$-glykosidisch spalten läßt. Dabei entsteht im molaren Verhältnis $\beta$d-Glucose und eine ringhydroxylierte Wuchsstoffsäure. Die phenolische OH-Gruppe ist $\beta$-glykosidisch gebunden. Das Molekül besitzt also die freie Säuregruppe des Wuchsstoffes.

2. Synthetische 2-Hydroxy-Naphthyl-1-essigsäure konnte nicht mit der hydroxylierten NES aus $NY_1$ identifiziert werden. Durch zusätzliche Kriterien konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß es sich dabei um 8-Hydroxy-Naphthyl-1-essigsäure (8HO-1NES) handeln muß.

3. Die früher gefundene NZ-Substanz, die regelmäßig nach NES-Inkubation in WKZ auftritt, ist die freie „8HO-1NES“.

4. Die Ring-Oxydation in ortho- bzw. in peri-Stellung, in der eine Vorbereitung des Wuchsstoffmoleküls für eine spezifische Wuchsstoffwirkung gesehen werden kann, stützt offensichtlich die „two point attachment"-Theorie der Wuchsstoffwirkung von MUIR und HANSCH (1953).

5. Die physiologische Rolle der Wuchsstoffglucoside ist wie die der freien ringhydroxylierten Wuchsstoffe noch ungeklärt. Die Glucoside könnten Entgiftungsprodukte, aber auch Teilmoleküle eines wirkungsaktiven Stoffes sein. Sie können ferner eine Bedeutung als Glucose-Überträger für die Cellulosesynthese besitzen.

Fräulein INGRID BLECHSCHMIDT danke ich für ihre sorgfältige Arbeit, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die gewährte Sachbeihilfe.

## Literatur

AUDUS, L. J.: Plant growth substances, II. edit. London 1959.

ENGELBRECHT, L.: Diskussionsbemerkung zum Vortrag MOTHES: Der Beitrag der Kinetinforschung zum Verständnis pflanzlicher Korrelationen. Tagg der Dtsch. Bot. Ges., Halle, 1961.

FOSTER, R. J., D. H. MCRAE and J. BONNER: Auxin-induced growth inhibition a natural consequence of two-point attachment. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **38**, 1014—1022 (1952).

GRIEHL, W.: Über eine neue Methode zur Herstellung von α-Naphthylessigsäure. Chem. Ber. **80**, 410—412 (1947).

HANSCH, C., and R. M. MUIR: The ortho effect in plant growth regulators. Plant Physiol. **25**, 389—393 (1950).

KARRER, P.: Lehrbuch der organischen Chemie, 11. Aufl. Stuttgart 1950.

KLÄMBT, H. D.: Die Chromatographie der Indolyl-3-essigsäure. Ber. dtsch. bot. Ges. **72**, 185—187 (1959a).

— Die 2 Hydroxy-Indol-3-essigsäure, ein pflanzliches Indolderivat. Naturwissenschaften **46**, 649 (1959b).

— Wachstumsinduktion und Wuchsstoffmetabolismus im Weizenkoleoptilzylinder. Reaktionsprodukte der IES in Abhängigkeit von den Inkubationskonzentrationen. Planta (Berl.) **56**, 309—321 (1961a).

— II. Stoffwechselprodukte der Indol-3-essigsäure und der Benzoesäure. Planta (Berl.) **56**, 618—631 (1961b).

— III. Stoffwechselprodukte der Naphthyl-1-essigsäure und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und der Vergleich mit jenen der Indol-3-essigsäure und Benzoesäure. Planta (Berl.) **57**, 339—353 (1961c).

MUIR, R. M., and C. HANSCH: On the mechanism of action of growth regulators. Plant Physiol. **28**, 218—232 (1953).

MARRÉ, E., and G. FORTI: Metabolic responses to auxin. III. The effects of auxin on ATP level as related to the auxin induced respiration increase. Physiol. Plant. **11**, 36—47 (1958).

MOTHES, K.: Über das Altern der Blätter und die Möglichkeit ihrer Wiederverjüngung. Naturwissenschaften **47**, 337—351 (1960).

SMITH, M. S., and R. L. WAIN: The plant growth regulating activity of dextro and laevo α(2-naphthoxy)propionic acid. Proc. roy. Soc. B **139**, 118—127 (1952).

TABONE, J., D. TABONE et S. THOMASSEY: La biosynthèse des esters β-glucosidiques chez les végétaux supérieurs. β-Estérification du glucose par l'acide anthranilique. Bull. Soc. Chim. biol. **36**, 565—566 (1954).

WAIN, R. L.: Chemical aspects of plant growth regulating activity. Ann. appl. Biol. **36**, 559—562 (1949).

YAKUSCHKINA, N. J., S. M. POROISKAYA and T. G. FILATOWA: Some peculiarities of translocation of organic substances in plants and the influence of irrigation on this process. [Russisch.] Fiziol. Rast. **3**, 423—430 (1956).

VELDSTRA, H.: Research on plant-growth substances. IV. Relation between chemical structure and physiological activity. Enzymologia **11**, 97—136, 137—163 (1944).

— The relation of chemical structure to biological activity in growth substances. Ann. Rev. Plant Physiol. **4**, 151—198 (1953).

Dr. HANS-DIETER KLÄMBT, Botanisches Institut der Universität, Bonn a. Rh., Meckenheimer Allee 170

Planta 57, 402—429 (1961)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Bonn

# ZUR SAUERSTOFFABHÄNGIGKEIT DES TRANSPORTES IN DEN SIEBRÖHREN*

Von

WOLFRAM ULLRICH

Mit 4 Textabbildungen

*(Eingegangen am 22. Juli 1961)*

## Einleitung und Problemstellung

Noch immer stehen sich bei der Deutung des Stofftransportes in den Siebröhren eine Reihe verschiedener Theorien gegenüber, von denen die inzwischen erheblich modifizierte Druck- bzw. Lösungsstromtheorie von MÜNCH (1930, 1943) und HUBER u. a. (1958) und die eines aktiven, einer beschleunigten Diffusion vergleichbaren Transportes von MASON u. a. (1928, 1937, 1941) sowie SCHUMACHER (1933, 1937, 1947) hier in erster Linie erwähnt seien. Trotz verschiedener Versuche in neuerer Zeit, einen Kompromiß oder Ausweg zu finden, fehlt bislang eine allgemein überzeugende Lösung. Eines ist diesen Theorien aber heute, nachdem die ursprüngliche Auffassung eines rein mechanischen Druckstromes abgeändert worden ist, mehr oder weniger gemeinsam, nämlich die Annahme eines Energieverbrauches im Phloemgewebe beim Transport, nach der einen Theorie nur für die Anreicherung der Stoffe und die Aufrechterhaltung des Druckgefälles in den Siebröhren (BAUER 1953, ZIEGLER 1956, HUBER 1958, ZIMMERMANN 1957a, b, 1958a, b), nach der anderen auch für den Mechanismus des Längstransportes selbst, was allerdings bisher allein durch die Versuche von WILLENBRINK (1957) mit Atmungsgiften experimentell sicher gestützt wird. Der tatsächliche Energiebedarf wird recht verschieden beurteilt und war bisher noch nicht direkten Experimenten zugänglich. Neuerdings hat CANNY (1960) nach Verfütterung von $^{14}CO_2$ an *Vitis*-Blätter den Verlust an radioaktivem Transportzucker in Form von $^{14}CO_2$-Ausscheidung des Blattstieles gemessen. Seiner Rechnung nach würde die Energie der auf dem Wege veratmeten Saccharose ohne erheblichen Konzentrationsabfall drei- bis vierfach zur Unterhaltung eines aktiven Transportes ausreichen, den er sich mit CURTIS (1929) und PALMQUIST (1938) an eine Plasmaströmung gekoppelt vorstellt. CANNY glaubt so auch die Konzentrationsgradienten in ZIMMERMANNS Versuchen erklären zu können,

* Teilabdruck einer Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bonn.

doch liegen für die von ihm geforderte Plasmaströmung kaum Beobachtungen vor (bei *Cucurbita* SMALL 1939). Welche Stoffwechselvorgänge diese Energien freilegen können, ist nur zum Teil bekannt; der Gedanke an die verbreiteten Atmungstypen liegt natürlich nahe.

Tatsächlich gelang WILLENBRINK erstmals der eindeutige Nachweis, daß spezifische Atmungsgifte auch lokalisiert und reversibel die Durchwanderung von verschiedenen Stoffen im Phloem hemmen können, was bisher nur am unübersichtlichen System ganzer Pflanzen beobachtet worden war (MOORE u. WILLIAMAN 1917) und das Bestehen eines einfachen Druckstromes in besonderem Maße in Frage stellt.

Daß das Plasma der Siebröhren selbst mit an den Stoffwechselvorgängen beteiligt ist, auch wenn diese nur der Erhaltung der Feinstrukturen dienen sollten, wie sie im Elektronenmikroskop in jüngster Zeit beobachtet worden sind (BUVAT 1960, KOLLMANN 1960), läßt sich aus dem Nachweis der Mitochondrien in ihm ableiten. Siebröhrenmitochondrien fand zuerst auf lichtoptischem Wege MCGIVERN (1957), später folgten elektronenmikroskopische Belege von SCHUMACHER u. KOLLMANN (1959), BEER (1959), BUVAT (1960) und KOLLMANN (1960).

ZIEGLERs Bedenken (1960b) wegen der guten Erhaltung der Mitochondrien von *Passiflora* bei SCHUMACHER u. KOLLMANN, die er selbst bei *Heracleum* nur für ganz junge Siebzellen bestätigte (1960a), erscheinen dem wenig bedeutsam, der die Siebröhren von *Passiflora* beim Fluoresceintransport und ihren Entwicklungszustand dabei beobachtet hat. Von zu jungen Siebröhren kann bei so deutlichen Kalloseablagerungen und nach dem Zerfall der Kerne nicht gesprochen werden. Vermutlich war für den negativen Ausfall der Versuche ZIEGLERs die Güte der Fixierung entscheidend. Aus einem Vorhandensein der Mitochondrien allein läßt sich natürlich noch nicht mit Sicherheit auf ein bestimmtes Atmungs- und Stoffwechselsystem schließen, wie Untersuchungen der Fermentaktivitäten von Mitochondrien verschiedener Organe vor allem an Tieren lehren, aus denen der große Unterschied in der Funktion dieser Organelle sehr deutlich hervorgeht (FELIX, DECKER u. ROKA 1953).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, in dieses Problem des Zusammenhanges zwischen dem Transport in den Siebröhren und gewissen Stoffwechselvorgängen, insbesondere von Atmung und Gärung, weiter einzudringen.

Die Literaturzitate der Arbeit beziehen sich meist nur auf neuere Veröffentlichungen, für die älteren sei auf die ebenfalls zitierten Sammelreferate verwiesen.

Die Experimente der Arbeit wurden in den Jahren 1957—1960 im Botanischen Institut der Universität Bonn durchgeführt. Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. SCHUMACHER, sei an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und für die Betreuung der Arbeit verbindlichst gedankt.

## *I. Zum Einfluß des Sauerstoffentzuges auf den Fluoresceintransport*

Um die Frage nach dem Sauerstoffbedarf, die ja für die Klärung der Energieverhältnisse des Transportmechanismus von grundlegender Bedeutung sein muß und die schon von WILLENBRINK (1957) angeschnitten

wurde, weiterzuführen, galt es zunächst, die Möglichkeit einer Sauerstoffversorgung der bezeichnenderweise fast stets intercellularenfreien Bündel in radialer Richtung durch das Nervenparenchym sowie die Frage eines Sauerstofftransportes in den Siebröhren selbst näher zu untersuchen. Deshalb wurde zuerst eine Reihe von Versuchen mit Stickstoffatmosphäre am Blattstiel nach WILLENBRINKs Anordnung und danach eine solche mit Sauerstoffentzug an der Blattspreite als dem normalen Ausgangspunkt der Stoffwanderung durchgeführt. Als Objekt diente für diese Versuche *Pelargonium zonale*.

**Methodik.** Da der handelsübliche Flaschenstickstoff noch bis zu einigen Prozent Sauerstoff enthält, konnte er für einwandfreie Versuche nicht direkt Verwendung finden, sondern mußte einer besonderen Reinigung unterworfen werden. Absorberwaschflaschen reichen wegen der in ihnen entstehenden großen Gasblasen und ihrer geringen Kapazität nicht aus; daher wurde folgende Apparatur zusammengestellt: Der Flaschenstickstoff wurde zunächst durch einen Blasenzähler, dann durch ein Steigrohr von unten in ein großes Absorptionsrohr gedrückt, das bei etwa 60 cm Höhe und 5 cm Durchmesser 1—1,2 Liter Lösung faßte, und in dem eine eingeschmolzene Fritte (Schott G 3) für feine Verteilung des Gases sorgte. Zur Befreiung von mitgerissener Lauge wurde der Stickstoff durch eine zweite Fritte mit einer nur wenige Zentimetern hohen Wasserschicht und zuletzt durch eine Waschflasche geleitet, bevor er in die Versuchskammern gelangte. Glashähne schützten vor dem Zurücksteigen der Lösungen nach Ab- oder Umschalten der Apparatur. Zur Absorption des Sauerstoffes diente eine Lösung von 100 g Natriumdithionit, 60 g Natriumhydroxyd und 5 g Natrium-Anthrachinon-$\beta$-sulfonat (als Katalysator und Indicator zugleich) in 1 Liter Wasser.

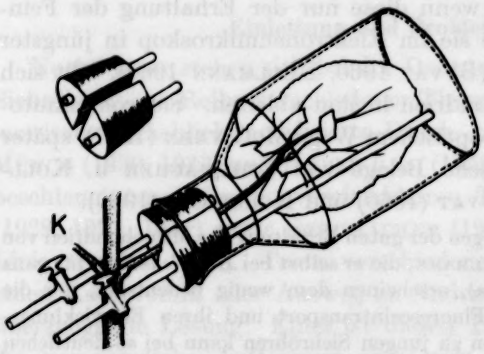



Abb. 1. Anordnung der Blattspreitenversuche bei *Pelargonium zonale*. *K* Ansatzstelle des Kontrollblattes

Für die Versuche an den Blattstielen von *Pelargonium* wurden ähnlich wie bei WILLENBRINK 5 cm lange und 3,5 cm dicke Glasrohrstücke und halbierte verkürzte Gummistopfen mit kleinen Aussparungen für den Blattstiel hergestellt, die sich einigermaßen dicht, wenn auch nicht vakuumdicht, abschließen lassen. Um eine Sauerstoffzufuhr durch das intercellularenreiche Parenchymgewebe zu vermeiden, mußten noch die Zentralleitbündel der Blattstiele auf 4 cm Strecke freipräpariert werden. Dies erfolgte nach der Methode von SCHUMACHER (1930) und WILLENBRINK (1957), die nach einiger Übung als gesichert gelten kann.

Für die Anaerobioseversuche an der Blattspreite dagegen wurden 0,5 Liter-Kulturflaschen aus Jenaer Glas verwendet (Abb. 1). Da hier für die Abdichtung mit den Gummistopfen ein größeres Stück des Blattstieles zur Verfügung stand, wurden diese länger gelassen und nur mit kleinen Kerben versehen. Bei einiger Übung ließ sich so der Blattstiel vakuumdicht einspannen. Als Zu- und Ableitung trug jede Stopfenhälfte noch ein Glasrohr mit Hahn; das Zuleitungsrohr mußte dabei

bis an den Boden des Gefäßes reichen, um eine gute Stickstoffdurchspülung zu sichern, während die Ableitung direkt am Stopfen mündete. Zu Beginn eines jeden Spreitenversuches wurde die Apparatur samt allen Leitungsschläuchen mit Stickstoff gründlich durchspült; währenddessen wurde das Blatt an den Nerven mit Fluorescein behandelt und in die Kammer eingebaut. Nach Verschluß der Kammer wurde der Stickstoffstrom umgeleitet, die Kammer mit einer Wasserstrahlpumpe evakuiert, mit Stickstoff aufgefüllt bis eine deutliche Stauung Überdruck anzeigte, nochmals evakuiert, erneut aufgefüllt und schließlich ein leichter Blasenstrom von Stickstoff bis zum Ende des Versuches durchgeleitet. Obwohl das Gas von Sauerstoff und Kohlendioxyd frei war, wurden alle Versuche im Dunkeln durchgeführt, um eine assimilatorische Sauerstoffproduktion im Gewebe zu vermeiden. Eine Änderung des Fluoresceintransportes durch Dunkelheit ist bei *Pelargonium* nach SCHUMACHER (1933) nicht zu erwarten, zumal wenn Versuch und Kontrolle den gleichen Bedingungen unterworfen sind.

Als Transportstoff diente trotz gewisser Bedenken, die verschiedentlich erhoben werden, Fluoresceinnatrium, was nach WILLENBRINKS gelungenen Hemmversuchen und Vergleichen mit P, N und $^{14}C$ durchaus gerechtfertigt erscheint; wegen seiner leichten Handhabung und seines einfachen Nachweises ist dieser Farbstoff für neue Versuchsanstellungen und größere Versuchsserien sogar vorgezogen worden.

Die Einführung des Fluoresceins in 0,1%iger Lösung erfolgte nach dem Verfahren von WILLENBRINK mit Hilfe von Watteflocken an den angeschabten Blattnerven, die mit Leukoplast gegen Austrocknung geschützt wurden. Spätestens eine halbe Stunde danach standen die Blätter endgültig im reinen Stickstoffstrom, so daß die Wanderung selbst unter völlig anaeroben Bedingungen ablaufen mußte. Erfahrungsgemäß ist mindestens eine so lange Zeit (bis zu mehreren Stunden) für das Eindringen des Farbstoffes in die Leitbahn anzusetzen.

Als Kontrollen erwiesen sich besonders in Zeiten geringerer Transportbereitschaft Blätter anderer Knoten der Pflanze wenig zuverlässig. Deshalb wurden außer bei den Blattstielversuchen mit Stickstoff alle Kontrollen und Versuche an Blattpaaren jeweils desselben Knotens angesetzt. Solche Blattpaare entstehen bei *Pelargonium* nur direkt oberhalb von Blütenknospen, so daß Blühbereitschaft auch bei den etwas vergeilt gezogenen Versuchspflanzen ständige Vorbedingung für ausreichendes Material war. Konstante Temperaturen konnten nur in einem Teil der Fälle eingehalten werden, da die Pflanzen in einem Gewächshaus kultiviert wurden; Anzuchtversuche in Klimakammern brachten nicht den gewünschten Erfolg, da *Pelargonium* auf mancherlei Außenfaktoren wie auch Spuren von Chemikalien und Leuchtgas sehr empfindlich und in unvorhersehbarer Weise reagiert. Obwohl also die Versuche selbst in einem gleichmäßig temperierten Laborraum stattfanden, konnte die Vorbehandlung der Pflanzen nicht völlig konstant gehalten werden. Der Vergleich innerhalb einzelner Blattpaare hebt jedoch derartige Fehler wieder auf.

Wo nicht zur Prüfung auf mechanische Schädigungen durch die Versuchsanordnung erforderlich, wurden die Kontrollblätter unpräpariert gelassen, um die Gefahr zusätzlicher Störungen durch mißlungene Präparationen nicht weiter zu erhöhen. Transportveränderungen waren so nicht zu beobachten.

Zur Kontrolle der Fluoresceinwanderung, meist 8—10 Std nach der Applikation, diente die Untersuchung frisch hergestellter Längsschnitte im Fluorescenzmikroskop. Eine Osram-Quecksilberhochdrucklampe (HBO 74) lieferte das UV-Licht, gefiltert wurde mit BG 12 als Vor- und OG 5 als Ocularfilter. Für die verschiedenen Transportintensitäten des Fluoresceins wurde eine Schätzwerteskala aufgestellt (von 0—6 ansteigend, so daß die höchsten Werte der stärksten Fluorescenz und damit auch dem stärksten Transport entsprachen). Die Differenzen der Schätzwerte zwischen Versuch und Kontrolle lieferten in den meisten Fällen die Ergebnisse.

**Ergebnisse.** Stickstoffatmosphäre am freigelegten *Blattstielbündel* hatte bei WILLENBRINKS Versuchen keine Transporthemmung zur Folge, auch wenn der Stickstoff bereits 24 Std zuvor das Leitbündel umspülte. Von den 18 Versuchen, die hier zur nochmaligen Überprüfung von WILLENBRINKS Ergebnissen angestellt wurden, fielen zwei wegen mangelnder Transportdisposition der Versuchspflanzen aus, vier deuteten zunächst auf eine gewisse Hemmung hin, doch waren zwei davon mechanischer Schädigung des Bündels durch die Präparation verdächtig. Da die übrigen zwölf Versuchsblattstiele normal transportierten bzw. zum Teil sogar die Kontrolle übertrafen, können WILLENBRINKS Befunde als gut bestätigt angesehen werden. Die Dauer der Stickstoffvorbehandlung betrug in meinen Versuchen im allgemeinen nur 3 Std. Der zwar kurzzeitige, aber vollständige Sauerstoffentzug auf einer begrenzten Strecke konnte demnach die Durchwanderung dieser Leitbündelstrecke nicht beeinträchtigen.

Für die Stickstoffversuche an der *Blattspreite* mußten zunächst einige Vorproben zeigen, daß den Blättern und Blattstielen die geschilderte Methodik nicht abträglich war, vor allem das stramme Einspannen zwischen die Gummistopfen und das Vakuum der Wasserstrahlpumpe.

Beides erwies sich tatsächlich als unschädlich, doch wurden anfangs durch Ungeschicklichkeit zuweilen Stauchungen und Knicke an den Blattstielen verursacht. Die Kontrollblätter blieben bei den folgenden Versuchen unbehandelt. Während vor die Blattstielversuche eine Stickstoffbegasung lückenlos vorgeschaltet werden konnte, war dies für die Spreitenversuche durch die technischen Möglichkeiten verwehrt, da die Applikation von Fluorescein an die Nerven einige Sorgfalt erforderte und daher nicht in das anaerobe Milieu verlegt werden konnte. Es blieb also nur übrig, die Blätter nach der Fluoresceinzugabe so schnell als möglich zu evakuieren und in der erwähnten Weise mit gereinigtem Stickstoff zu umgeben. Beeinträchtigungen der Ergebnisse hierdurch sind nicht zu erwarten, da erfahrungsgemäß bis zum Eintritt des Farbstoffes in die Siebröhren eine halbe bis mehrere Stunden vergehen. Eine Vorbehandlung der Blattspreite mit Stickstoff wurde nur in Einzelfällen etwa 12 Std lang durchgeführt, mußte aber natürlich für den Fluoresceinbehandlungsvorgang kurz unterbrochen werden. Eine Änderung der Ergebnisse wurde dabei nicht bemerkt. Auch Hungervorbehandlung durch mehrtägiges Einstellen der Pflanzen in den dunklen Versuchsraum bei etwa 20° C wurde in einigen Versuchen ohne erkennbaren Erfolg geprüft.

Eine erste Versuchsgruppe ohne Vorbehandlung enthielt nur sieben auswertbare Versuche, in vieren davon transportierte die Kontrolle besser als das Versuchsblatt. Die damit zunächst angedeutete schwache Hemmung blieb in der zweiten Serie jedoch völlig aus. Hier waren 22 Versuche von allen mitunter auftretenden Störungen durch Fluoresceinübertritt in Xylem oder Parenchym frei und daher voll auswertbar. Um eine gewisse individuelle Streuung des Materials, die sich natürlich nie ausschließen läßt, mit erfassen zu können, wurde noch zusätzlich statistisch überprüft (nach PÄTAU 1943).

Dafür wurden die Differenzen der Transportschätzwerte des Versuchs- und Kontrollblattstieles einer Nullwertprobe unterzogen. Unter der Voraussetzung genauer Schätzwerte war für $n = 22$ hier $P = 0{,}87$, d. h. die Wahrscheinlichkeit, daß durch Anaerobiose keine Änderung des Fluoresceintransportes erreicht wurde, ist sehr hoch.

Das negative Ergebnis dieser Anaerobioseversuche erscheint nach den bisherigen Ausführungen recht eindeutig und überraschte in der jetzigen Form um so mehr, als entsprechend der seit den Versuchen WILLENBRINKs bekannten Cyanidempfindlichkeit des Transportes in den Siebröhren eine Abhängigkeit von der Endoxydation der Atmung mit ihren Häminfermentreaktionen eigentlich zu erwarten war.

Es bleibt auch die Frage, worauf die andersartigen Ergebnisse von CURTIS (1929) und von MASON u. PHILLIS (1936) zurückzuführen sind. Bei MASON u. PHILLIS liegt der Verdacht einer ungünstigen Wirkung der Vaseline oder irgendwelcher Nebenbestandteile derselben recht nahe, zumal CURTIS durch Abschluß mit reinem Paraffin keine Hemmung erreichte. CURTIS Stickstoffversuche aber sind nur auf Trockengewichtsveränderungen bezogen und außerdem betrachtete sie der Autor selbst als nicht statistisch gesichert. Darum können auch wir ihnen keine Bedeutung mehr beimessen.

### *II. Zur Gärung des isolierten Phloems von Heracleum*

Aus den bisherigen Versuchsanstellungen ging also hervor, daß der Fluoresceintransport offenbar von der Zufuhr freien Sauerstoffes sowohl an die Blattstiele wie an die Blätter unabhängig ablaufen kann. Daraufhin sollte nun untersucht werden, ob nicht möglicherweise anaerobe Gärungsvorgänge im Phloem für die Unterhaltung eines Stofftransportes in Frage kommen. Über die Fähigkeit zur Atmung ganzer Leitbündel berichteten schon KURSANOV u. TURKINA (1952) sowie WILLENBRINK (1957), bei isolierten Phloem- und Xylemteilen ZIEGLER (1958), über anaerobe Gärungen dieser Gewebe scheint jedoch noch nichts bekannt zu sein.

**Material und Methodik.** Die Leitbündel von *Pelargonium* lassen sich zwar mit einiger Sorgfalt gut präparieren und auch ihre Atmung wurde schon gemessen (WILLENBRINK), doch ist eine Trennung von Xylem und Phloem mit der Klinge für größere Versuchsansätze zu zeitraubend, während sie in kleinerem Umfang seinerzeit SCHUMACHER (1930 u. 1933) für den Nachweis des Transportes im Phloem diente. So wurde zu einem anderen Objekt gegriffen, obwohl hierbei der Nachteil des fehlenden Vergleiches mit Transportversuchen in Kauf genommen werden mußte.

Von der Beobachtung, daß sich die Leitbündel des Blattstielinnern mancher Umbelliferen leicht von selbst aus dem Parenchym herauslösen und in Wellen die Markhöhle erfüllen, berichteten bereits einige Autoren, so SCHWARZ (1926) und TROLL (1949, dort auch ältere Angaben zitiert). Wegen ihrer mächtigen Leitbündelausmaße eignen sich Vertreter der Gattung *Heracleum*, bei denen auch Phloem und Xylem recht gut zu trennen sind, für Reihenversuche am besten. ZIEGLER (1958) und ZIEGLER u. MITTLER (1959) verwendeten deshalb *Heracleum mantegazzianum* schon für ihre Atmungsmessungen und Zuckeranalysen im Phloem

und Xylem. Ein zuverlässiger Beweis, daß diese isolierten Leitbündel noch aktiv leiteten, ist allerdings bisher von ihnen noch nicht erbracht worden. Da mir die kaukasische Species nicht in größerer Menge zur Verfügung stand, wählte ich unsere einheimische Wildart *Heracleum sphondylium*, die an einigen Lößstandorten der Bonner Umgebung ebenfalls 2—3 cm dicke und bis zu 60 cm lange Blattstiele hervorzubringen vermag. Leider stehen diese nur während relativ kurzer Zeit des Jahres zur Verfügung, da die Pflanzen nach dem Austreiben und Vertrocknen des Blütenstandes nur noch wenige und kleinere Blätter bilden.

Die nicht zu alten Blattstiele — es wurden überwiegend solche von fast oder soeben ausgewachsenen Grundblättern, bei fortschreitender Jahreszeit aber auch entsprechende Blattstiele des Stengels verwendet — wurden am Standort dicht an der Insertionsstelle abgeschnitten und sofort in ein mitgebrachtes Wassergefäß gestellt, um ein vorzeitiges Welken zu vermeiden. Zur Präparation wurde der Blattstiel in nur 10—16 cm lange und dadurch in sich ziemlich einheitliche Stücke zerlegt und diese längs gespalten. Das wasserreiche Parenchymgewebe wurde mit einem Skalpell bis an die Leitbündel heran weggeschabt, diese mit einer Pinzette am Ende gepackt und herausgehoben. Da nicht nur die zentralen, schon weitgehend losgelösten Leitbündel verwendet wurden (vgl. auch ZIEGLER 1958), mußte auf geringe mechanische Beanspruchung geachtet werden, eine Forderung, die bei allen Bündeln außer den an der Blattstielaußenseite verwachsenen leicht zu verwirklichen ist. Danach wurde das Xylem vom Phloem abgezogen, was wegen der nur schwach und unvollständig ausgebildeten Leitbündelscheide keine Schwierigkeiten bereitet, das Phloem von den beschädigten Enden befreit und zu gleichen Teilen in Versuchsstück und Kontrollstück zerlegt, so daß die Ansätze immer aus gleichartigem Material bestanden. Fünf bis sieben solcher etwa 5—7 cm langen Phloemstücke aus einem Blattstielstück reichten mit 40—120 mg Frischgewicht als Probe aus und lieferten bei Verwendung von 15 ml-Warburggefäßen in wenigen Stunden schon große Ausschläge. In den Gefäßen gelangten die Phloemteile stets gewunden in den Zentraleinsatz und wurden dort mit wenig Wasser befeuchtet oder mit Zucker- bzw. Cyanidlösungen behandelt, während die Lauge oder Säure (2 ml 2%ige Kalilauge oder n/10 = 0,5%ige Schwefelsäure) in den größeren Außenraum gefüllt wurde. Als Gas wurde entweder Luft verwendet (Atmungsversuche) oder Stickstoff aus der schon bei den Anaerobiose-Transportversuchen beschriebenen Apparatur, der durch ein alkalisches Dithionitbad vom Sauerstoff aber auch von allem Kohlendioxyd befreit war (Gärungsversuche). Die Flüssigkeitsmenge um die Proben mußte vor allem wegen dieser Anaerobioseversuche klein gehalten werden, um darin die bei mittleren $p_H$-Werten schwer kontrollierbare $CO_2$-Retention so weit als möglich herabzusetzen. Bezugsgröße bei den Gasumsetzungen war stets das Frischgewicht am Ende der Messung.

**Ergebnisse.** Über die Atmung und aerobe Gärung isolierter, freilich auch abgeschnittener Leitbündelstücke liegen wie erwähnt in der Literatur schon gewisse Angaben vor. So verwendeten KURSANOV u. TURKINA (1952a u. b), TURKINA u. DUBININA (1953) die Bündel von *Plantago*, *Beta* und *Caragana*, WILLENBRINK (1957) die von *Pelargonium zonale*, *Primula beesiana*, *Bunias orientalis*, *Omphalodes verna*, *Tussilago farfara* und *Plantago major*. Die dabei beobachteten Respirationsquotienten lagen um 1,0 oder etwas darüber, letzteres besonders bei *Pelargonium*; die absoluten Atmungswerte lagen bei den Leitbündeln oft beträchtlich über denen des Restblattstieles, so daß KURSANOV u. TURKINA wie auch WILLENBRINK einen gesteigerten Stoffwechsel vor

allem wegen der in ihnen ablaufenden Transportvorgänge vermuteten. CANNY (1960) errechnet aus seinen Versuchen mit radioaktivem $CO_2$ jedoch geringere Atmungswerte. KURSANOV u. TURKINA wie WILLENBRINK glaubten nach ihren Messungen an ganzen Leitbündeln dem Phloem wegen seines größeren Anteiles lebender Zellen den Hauptteil der Atmung zurechnen zu müssen. Dies konnte aber inzwischen von ZIEGLER (1958) an *Heracleum mantegazzianum* näher überprüft werden. Nach ZIEGLER atmen die relativ parenchymreichen Xylembündel bei diesem Objekt ebenso stark wie Phloembündel schon bei Bezug auf das Frischgewicht, vor allem aber bei Bezug auf Proteinstickstoff. Die RQ-Werte für das Phloem von *Heracleum mantegazzianum* lagen bei seinen Versuchen im Gegensatz zu den Objekten von KURSANOV u. TURKINA und WILLENBRINK zwischen 0,9 und 1,0, die des Xylems noch niedriger, nämlich um 0,82. Durch Cyanidvergiftung sank der Sauerstoffverbrauch, und der RQ-Wert stieg an. Eine Beziehung zu einem gleichzeitig ablaufenden Transport konnte jedoch bei keinem dieser Versuche hergestellt werden.

Auf diesen Befunden der Autoren sollten nun die eigenen Experimente aufbauen. Einige RQ-Bestimmungen nach der direkten Warburg-Methode im Gefäßpaar mit Luft ergaben für *Heracleum sphondylium* Werte zwischen 0,9 und 1,05, was größenordnungsmäßig auch den Angaben ZIEGLERs über die verwandte Art *Heracleum mantegazzianum* entsprach. Weit wichtiger erschien es jedoch, die Fähigkeit des Phloems zu einer anaeroben Gärung zu überprüfen, da in einem so tief im Verband eingebetteten und praktisch intercellularenfreien Gewebe mit einem Mangel an Sauerstoff bestimmt gerechnet werden muß. Für viele parenchymatische und Teilungsgewebe ist lebhafte anaerobe Gärung schon seit langem nachgewiesen (Literaturzusammenfassung u. a. bei TURNER 1960), für Leitbündel liegen meines Wissens bisher nur die erwähnten Messungen einer Atmung und leichten aeroben Gärung vor. Daher wurde zunächst bei sechs Proben nach Vertreiben aller Luft aus den Warburggefäßen durch gereinigten Stickstoff 4 Std lang die $CO_2$-Produktion gemessen. Die Werte lagen mit 150—350 $\mu$l pro Stunde und Gramm Frischgewicht recht hoch (etwa so hoch wie nach CANNY 1960 am intakten Blattstielphloem von *Vitis*) und blieben konstant. Von einer weiteren Reihe von sechs Versuchen ergaben fünf noch nach $21^1/_2$ Std gleichhohe und konstante Kohlendioxydwerte, drei noch nach 26 Std, während bei den anderen offenbar die Kohlenhydratreserven nicht länger ausgereicht hatten. Einen stärkeren Abfall nach bereits 10 Std zeigte ein weiterer Ansatz, dessen Material wahrscheinlich schon zuvor Hunger gelitten hatte. Wurden die Phloembündel in den Zentraleinsätzen der Warburggefäße statt in Wasser in 0,1-molare Saccharoselösung gelegt, so war ihre anaerobe Gärung angeregt; drei der sechs

Proben lieferten über 9 Std konstant 10—30% mehr $CO_2$ als die Kontrollen ohne Zuckerzusatz, zwei blieben unbeeinflußt, einer der sechs wies nach 10 Std eine um 50% höhere $CO_2$-Produktion auf als die Kontrolle.

Während bei allen diesen Versuchen die Werte der ersten Stunden recht zuverlässig erschienen, muß bei einigen — auch der Kontrollen — in länger andauernden Versuchen, also etwa in solchen über 24 Std, vielleicht mit einer zusätzlichen mikrobiellen Gärung gerechnet werden.

Um nun die Leistungsfähigkeit des hier nachgewiesenen anaeroben Systems abschätzen zu können, brauchte man vor allem die Größe der anaeroben Gärung im Vergleich zur normalen Atmung. Dazu wurden von den gleichartigen Phloemteilen eines Bündelstückes in der unter „Material und Methodik" geschilderten Weise jeweils einer zur Messung des Sauerstoffverbrauches, der andere zur Bestimmung der anaeroben Kohlendioxydabgabe verwendet. Von jedem Gefäßpaar wurde also eines in Luft mit Lauge beschickt, während durch das andere nach Säurezugabe etwa 20 min lang gereinigter Stickstoff durchgeleitet wurde. Für eine zahlenmäßige Erfassung wurde der Quotient aus der anaeroben $CO_2$-Abgabe und dem aeroben $O_2$-Verbrauch gebildet, der für $RQ = 1$ auch dem Quotienten aus anaerobem und aerobem $CO_2$ entspricht. Die RQ-Werte ZIEGLERS und der eigenen Versuche zeigen, daß dies in erster Näherung möglich ist. Lägen sie um 0,9, so wären die angegebenen Quotienten noch um etwa 10% zu niedrig, was für die Größenordnung aber keine wesentliche Rolle spielt. Von den zwölf bei der Auswertung zur Verfügung stehenden Versuchen ergaben acht einen Quotienten ($CO_2$ anaer./$O_2$ aer.) von über $^1/_3$, was auf einen höheren Kohlenhydrateinsatz im anaeroben als im aeroben Milieu schließen läßt, sofern die Werte nicht durch Ausscheidung von sog. „Extra-$CO_2$" hervorgerufen sind (TURNER 1960); ja in vier dieser Fälle wurden $^2/_3$ überschritten (so im Beispiel der Abb. 2). Bei den vier Versuchen ohne diesen Effekt, der möglicherweise ein echter Pasteureffekt ist, schien die Kohlenhydratreserve wiederum nicht auszureichen, denn die $CO_2$-Produktion sank bereits nach wenigen Stunden weiter ab. Kohlenhydrate, die eventuell für eine noch zusätzlich beteiligte Milchsäuregärung verbraucht werden, würden natürlich bei der $CO_2$-Messung nicht in Erscheinung treten und setzten dementsprechend einen nochmals höheren Einsatz voraus (BARKER u. EL SAIFI 1952).

Der Nachweis einer potentiell recht leistungsfähigen anaeroben Gärung des Phloems steht natürlich in einem gewissen Gegensatz zu der von WILLENBRINK (1957) gefundenen Cyanidempfindlichkeit des Stofftransportes, die ja auf eine Mitwirkung der Cytochromoxydase schließen ließ, und so muß hier die Frage aufgeworfen werden, an welcher Stelle des Stoffwechsels Cyanid in den verschiedenen Konzentrationen angreift. Nach WILLENBRINK reagieren die freigelegten Blattstielleitbündel von

*Pelargonium* auf $2 \times 10^{-3}$ m schon eindeutig mit einer Transporthemmung, was eben als eine spezifische Hemmung der cyanidempfindlichen Cytochromatmung gedeutet wird. Für die Sauerstoffaufnahme von *Heracleum mantegazzianum* hatte ZIEGLER (1958) bereits eine Kurve der Cyanidabhängigkeit entworfen, nach der die Hemmung ab etwa $10^{-3}$ m deutlich wird und bei $5 \times 10^{-3}$ m Blausäure bereits ihren maximalen Wert erreicht. TURKINA u. DUBININA (1953) hemmten mit $10^{-2}$ m KCN und berichteten von einer geringen Restatmung bei ihren Objekten. Einige orientierende Versuche an *Heracleum sphondylium* mit $2 \times 10^{-3}$ m KCN in Pufferlösung von $p_H = 6$ stimmten recht gut mit ZIEGLERs Kurve überein, sofern man diese auf eine echte logarithmische Skala brachte.

Einige weitere Proben in ungepufferten alkalischen Cyanidlösungen reagierten weit weniger empfindlich; die Gefahr einer Blausäuredestillation war zwar stark herabgesetzt, zugleich aber wohl auch der Dampfdruck des Giftes im Gewebe. Auf eine nähere Untersuchung der $p_H$-Abhängigkeit etwa nach der Methode von ROBBIE (1948) wurde verzichtet, zumal die Testversuche zur Gärungshemmung im sauerstofffreien Medium wegen der schwer kontrollierbaren $CO_2$-Retention ohnehin im schwach sauren Bereich durchzuführen waren.

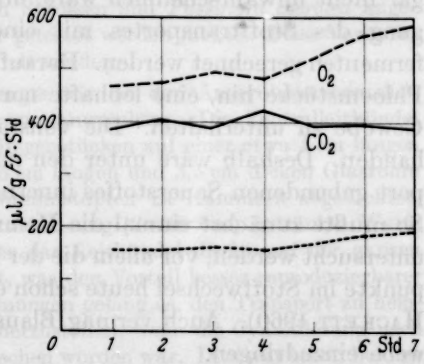



Abb. 2. Vergleich der $CO_2$-Abgabe in $N_2$ und der $O_2$-Aufnahme (stellvertretend für die $CO_2$-Abgabe) in Luft bei Phloem von *Heracleum sphondylium*. ------ $^1/_3\,O_2$-Kurve als theoretischer Richtwert für die $CO_2$-Abgabe bei reiner alkoholischer Gärung und gleichem KH-Einsatz wie in Luft

Es kann also für die Atmungshemmung durch Cyanid auch bei *Heracleum sphondylium* qualitativ ZIEGLERs Kurve zugrunde gelegt werden.

Die gleichfalls nur der Orientierung dienende kleine Testreihe über die Cyanidempfindlichkeit der anaeroben Gärung erbrachte etwas schwächere Hemmungsgrade als die von WARBURG (1925 u. 1948) angegebenen, was leicht auf Cyanidverluste bei der Stickstoffdurchspülung der Gefäße zurückgeführt werden kann. Nach WARBURG wird die anaerobe Gärung von Hefezellen durch $10^{-2}$ m HCN zu etwa 50% gehemmt; größenordnungsmäßig stimmt damit auch die Empfindlichkeit der Gärung in den Phloembündeln von *Heracleum sphondylium* überein.

Für eine Energieversorgung des Phloems käme nach diesen Ergebnissen und unter Berücksichtigung der Tatsache, daß Sauerstoff für den Transport nicht notwendig ist, eine anaerobe Gärung durchaus in Frage, wenn von ihr auch keine hohen Energieausbeuten zu erwarten sind. Natürlich darf dabei nicht außer acht gelassen werden, daß alle bisher durchgeführten Atmungs- und Gärungsversuche, auch die anderer

Autoren, mit abgeschnittenen isolierten Bündelstücken durchgeführt wurden, bei denen das Fortbestehen eines Transportes nicht ohne weiteres vorausgesetzt werden darf. Die relativ hohe Cyanidempfindlichkeit des Stofftransportes im intakten Phloem nach den Ergebnissen von WILLENBRINK, die um eine Zehnerpotenz oder mehr (WILLENBRINK verwendete ungepufferte, also alkalische Cyanidlösungen mit geringerem Blausäuredampfdruck) über der einer anaeroben Gärung liegt, ist mit den geschilderten Versuchen aber noch nicht erklärt. Obwohl also eine Gärung unter den natürlichen, sicherlich ungünstigen Sauerstoffbedingungen gar nicht unwahrscheinlich wäre, muß weiterhin bei der Energieversorgung des Stofftransportes mit einer Beteiligung von Schwermetallfermenten gerechnet werden. Darauf deutet auch die Fähigkeit isolierter Phloemstücke hin, eine lebhafte normale Sauerstoffatmung wie andere Gewebe zu unterhalten. Die vollständigen Enzymsätze sind also vorhanden. Deshalb wäre unter den natürlichen Verhältnissen ein Transport gebundenen Sauerstoffes innerhalb des Phloems durchaus denkbar. So mußte zunächst einmal die Hemmwirkung der Atmungsgifte weiter untersucht werden, vor allem die der Blausäure; bei ihr sind die Angriffspunkte im Stoffwechsel heute schon einigermaßen bekannt (JAMES 1953, HACKETT 1960). Auch vermag Blausäure mit am leichtesten in die Gewebe einzudringen.

### *III. Zur Hemmung des Fluoresceintransportes mit Cyanid*

Wie schon einleitend erwähnt, untersuchte erstmals WILLENBRINK (1957) die Hemmung des Transportes verschiedener Substanzen durch spezielle Atmungsgifte, der die Gifte lokalisiert an den freipräparierten Blattstielleitbündeln von *Pelargonium* ansetzte, was ihm gestattete, die Stoffwanderung allein und ohne Beeinflussung der Aufnahmevorgänge im Blattparenchym zu erfassen. Wie er feststellen konnte, war die Reaktion auf die einzelnen Substanzen recht ungleich empfindlich: Cyanid und Dinitrophenol hemmten bei Behandlung vor der Fluoresceingabe schon in einer Konzentration von $10^{-3}$ m zuverlässig, wobei die Wiederaufnahme des Transportes nach Beseitigung der Gifte eine irreversible Schädigung ausschloß. Andere Hemmstoffe wie Fluorid und Arsenit mußten in wesentlich höherer Konzentration vorliegen. KENDALL (1955) hatte bei ähnlichen Versuchen an Bohnenpflanzen weniger eindeutige Hemmungen zu verzeichnen. Daß WILLENBRINKs Hemmversuche nicht nur für Fluorescein galten, sondern auch für pflanzeneigene Stoffe wie Phosphor und Stickstoff sowie im Blatt aus $^{14}CO_2$ synthetisierte Kohlenhydrate, beweist ihre allgemeinere Gültigkeit und war für mich zugleich Anlaß, mich bei entsprechenden Versuchen ebenfalls jenes im Gegensatz zu radioaktiven Isotopen einfach zu handhabenden Transportfarbstoffes zu bedienen.

Da im ersten Kapitel eine weitgehende Sauerstoffunabhängigkeit gezeigt werden konnte, was gegen die Beteiligung einer normalen Sauerstoffatmung spricht, andererseits aber, wie soeben beschrieben, der Transport durch Atmungsgifte gehemmt wurde, sollte jetzt Cyanid sowohl am freipräparierten Leitbündel und Sproß als auch an den Blattspreiten appliziert werden. Natürlich konnten an der Spreite Aufnahme und Wanderung des Fluoresceins nur mehr oder weniger gemeinsam erfaßt werden.

**Material und Methodik.** Die reinen Transporthemmversuche wurden mit den schon erwähnten Blattpaaren von *Pelargonium zonale* durchgeführt. Darüber hinausgehende vergleichende Transport- und Atmungsbestimmungen wurden jedoch an in geeigneter Weise präparierten Sprossen und *Passiflora coerulea* angestellt, deren Cyanidempfindlichkeit zuvor getestet werden mußte. Diese Versuche sollen an anderer Stelle gesondert behandelt werden.

Für die *Pelargonium*-Blattstiele gelangte wie bei den Anaerobioseversuchen wieder die Technik von WILLENBRINK zur Anwendung. Die Zentralleitbündel wurden mit zurechtgebrochenen Rasierklingenstücken auf einer etwa 4 cm langen Strecke freigelegt, die schon erwähnten 5 cm langen und 3,5 cm dicken Glasrohre darübergeschoben und mit halbierten Gummistopfen zu Kammern abgedichtet. Zur Vergiftung wurde entweder mit Cyanidlösung ($2 \times 10^{-3}$ m) getränkte Watte auf den Boden der Kammer gelegt oder das Leitbündel direkt auf der ganzen Strecke mit getränkter Watte umwickelt, was den Vorteil besser reproduzierbarer Giftkonzentration bot. In beiden Anordnungen gelang es, den Transport zu hemmen, ihn aber nach 2—3 Tagen wieder herzustellen, wenn die Cyanidlösung nach etwa 8 Std Einwirkungszeit gut ausgewaschen worden war. Dies war schon bei den Versuchen WILLENBRINKs unbedingte Voraussetzung für ihre theoretische Auswertung, denn nur so konnten Störungen durch die Präparation und Schädigungen durch die Vergiftung sicher unterschieden werden.

Für die Blattspreitenversuche wurden die Flaschen der Anaerobioseversuche wiederverwendet (Abb. 1). Die Cyanidatmosphäre konnte unmittelbar nach oder schon vor der Fluoresceinbehandlung durch Einlegen von Watte, die mit der gewünschten Kaliumcyanidlösung getränkt wurde, hergestellt werden. Eine kurze Unterbrechung der Begasung hat ja in diesem Fall weit geringere Bedeutung als bei den Stickstoffversuchen ein Sauerstoffzutritt. Um die Hemmung der Aufnahme von einer Transporthemmung besser unterscheiden zu können, wurde auch eine Anzahl von Versuchen mit gemeinsamer Cyanid- und Fluoresceinlösung behandelt, so daß das Cyanid im wesentlichen an der Fluoresceinzugabestelle und nur wenig außerhalb angreifen konnte. Bei getrennter Anwendung wird überwiegend der Transport erfaßt. Für die Technik der Fluoresceinzugabe und die Transportkontrolle sei auf den entsprechenden Abschnitt des ersten Kapitels verwiesen.

**Ergebnisse.** Zur Bestätigung der Befunde von WILLENBRINK über die reversible Hemmung des Stofftransportes an freipräparierten Leitbündeln des Blattstieles von *Pelargonium* wurde nur eine kleine Gruppe von Versuchen angesetzt. $2 \times 10^{-3}$ molare Cyanidlösung oder der Blausäuredampf darüber hemmten bei kurzem Vorsprung der Cyanidbehandlung den Fluoresceintransport bereits sicher. Wiederherstellung der Fluoresceinwanderung nach achtstündiger Blausäureeinwirkung und 40—50stündiger Erholungszeit gelang in 5 von 6 Fällen gut, so daß weitere Wiederholungen nicht mehr notwendig schienen.

Wichtig war nun auch die Frage, ob sich ein Transportvorgang von den Blattspreiten her, den Ausgangsorten vieler normaler Stoffwanderungen, hemmen läßt, wobei auch die Scheidenzellen um die Siebröhren der Nervenendigungen erfaßt werden, denen in jedem Falle die Aufgabe obliegt, die natürlichen Wanderstoffe der Pflanze vermutlich gegen ein Konzentrationsgefälle, wie es zuerst von MASON u. MASKELL (1928) und inzwischen noch des öfteren beobachtet und errechnet wurde, in die Siebröhren zu bringen. 0,002 m KCN mit 0,1% Natriumfluorescein (0,0028 m) in gemeinsamer Lösung vermochte indessen bei *Pelargonium* keine Hemmwirkung auf den Fluoresceintransport hervorzurufen und auch bei 0,02 m war diese nur mäßig (Tabelle), so daß die Wanderfront

Tabelle. *Cyanidwirkung auf den Fluoresceintransport bei Vergiftung der Blattspreite von Pelargonium zonale*

| | Anzahl der Versuche | Hemmung | | |
|---|---|---|---|---|
| | | nicht | halb | vollständig |
| KCN und Fluorescein in gemeinsamer Lösung: | | | | |
| KCN 0,002 m | 5 | 5 | — | — |
| 0,01 m | 3 | 1 | 2 | — |
| 0,02 m | 6 | 3 | 2 | 1 |
| HCN-Gas, Fluoresceinzugabe zu gleicher Zeit: | | | | |
| KCN 0,002 m | 4 | 4 | — | — |
| 0,02 m | 20 | 4 | 7 | 9 |
| 0,1 m | 4 | — | — | 4 |
| HCN-Gas, 2 Std vor Fluorescein geboten: | | | | |
| KCN 0,02 m | 16 | 1 | 9 | 6 |

*Anmerkung:* halb gehemmt: Fluorescein noch im oberen Ende des Blattstieles nachweisbar; vollständig gehemmt: Farbstoff nur in den Blattnerven vorhanden.

des Fluoresceins bei Versuchsende noch meist den gesamten Blattstiel passiert hatte. NELSON u. GORHAM (1957a u. b) glaubten, bei gleichzeitiger Gabe von markiertem Zucker und 0,01 m KCN zwar nur eine leichte Hemmung der Aufnahme, aber eine recht auffällige Hemmung des Saccharosetransportes nach wenigen Zentimetern festgestellt zu haben. In unserem Fall schien dagegen der Hemmstoff in gelöster Form schlechter einzudringen als der Wanderstoff, so daß Aufnahme und Transport nicht zuverlässig gehemmt werden konnten. Wurde Blausäure direkt nach der Fluoresceingabe, aber gasförmig, verabreicht, so war die Hemmung stärker. 0,02 m (davon 1,5 ml als KCN-Lösung mit Watte in die 0,5 Literflasche gebracht) vermochten in der knappen Hälfte der Fälle (9 von 20) den Transport schon vor dem Erreichen des Blattstieles zu blockieren, Fluorescein war also nur noch im Phloem der Blattnerven

gewandert; in weiteren sieben Versuchen war der Farbstoff bis in den oberen Teil des Blattstieles gelangt, und nur vier Versuche zeigten keine Hemmwirkung, ein deutlicher Hinweis, daß der Transport durch Cyanid tatsächlich stärker zu hemmen war als die Fluoresceinaufnahme. Entsprechend den Versuchen am Blattstiel ließ sich also auch hier die Transporthemmung durch eine etwa zweistündige Vorbehandlung mit der gleichen Cyanidkonzentration noch leicht verstärken. Von 16 derartigen Versuchen war nur noch bei einem der ganze Blattstiel durchwandert, in 9 Fällen das Fluorescein noch im oberen Ende des Blattstieles und in sechs nur noch in den Blattnerven selbst nachzuweisen. Höhere Konzentrationen als 0,02 m, z. B. 0,1 m KCN, führten bei gleicher Anwendung als Gas zu schweren sichtbaren Schädigungen der Blätter, z. T. sogar zu starken Nekrosen, so daß sie für meine Zwecke nutzlos erschienen.

Bei diesen Ergebnissen überrascht einmal der Befund, daß an den Nerven um etwa eine Zehnerpotenz höhere Konzentrationen als am präparierten Blattstiel notwendig sind, um mit ähnlicher Sicherheit den Fluoresceintransport zu hemmen, und daß zum anderen die Wirkung nicht auf der Stelle, sondern erst nach einer gewissen Wanderung einsetzt. Da die Cyanidhemmung im Falle der gemeinsamen Fluorescein- und Cyanidgabe am geringsten war, scheint der Aufnahmemechanismus selbst auch am wenigsten betroffen oder zumindest gegenüber dem Zutritt des Giftes etwas besser geschützt zu sein. Dieser Schutz müßte allerdings in einer selektiven Aufnahmeverweigerung für Cyanid bestehen, denn Fluorescein kann ja offensichtlich in beträchtlichem Maße eindringen. Ob der erhöhte $p_H$-Wert der Cyanidlösungen seinerseits für die Fluoresceinaufnahme wieder erleichternd wirkt (vgl. Döhring 1935), muß dahingestellt bleiben. Die Hemmung des Blausäuregases scheint demgegenüber vorwiegend vom Mesophyll her die Phloembündel anzugreifen, denn das Nervengewebe an der Fluoresceinzugabestelle ist unter dem Pflaster dem Blausäuregas weit weniger ausgesetzt als der Lösung in den anderen Versuchen. Gegen ein Nachlassen des Transportes nur wegen gestörter Aufnahme oder wegen Speicherung des Farbstoffes im Plasma der Sieb- und Geleitzellen (Schumacher 1933 u. 1937, Arisz 1952) spricht der steile Gradient an der Front des Fluoresceintransportes, der wiederum an die Ergebnisse von Nelson u. Gorham mit radioaktivem Zucker erinnert.

So bestätigen und erweitern die hier angeführten Transporthemmversuche die Ergebnisse Willenbrinks. Obwohl vielleicht die Unterschiede in der wirksamen Konzentration einige Deutungsschwierigkeiten verursachen, auf die aber erst später kurz eingegangen werden soll, muß an eine Mitwirkung schwermetallhaltiger Fermente beim Transport gedacht werden. Der nächstliegende Gedanke an die Cytochromoxydase

und die Atmung mit molekularem Sauerstoff muß aber auf Grund der Anaerobioseversuche zurücktreten. Unter anderen schwermetallhaltigen Fermenten gibt es nun gerade im Phloem in größeren Mengen eine unspezifische Peroxydase, deren Bedeutung hier bisher noch völlig ungeklärt ist. Diese Peroxydase soll daher im Folgenden auf die Möglichkeit ihrer Beteiligung beim Transportgeschehen untersucht werden.

### *IV. Zum Vorkommen der Peroxydase in den Siebröhren*

Als RACIBORSKI (1898) die allgemeine Verbreitung einer Guajakreaktion im Phloemgewebe erkannte, nannte er den Inhaltskörper des Leptoms, der mit Hilfe von Wasserstoffperoxyd Guajak und andere Phenolkörper oxydiert, „Leptomin" und verglich ihn mit dem Hämoglobin und Hämocyanin des tierischen Blutes, denen ja die Aufgabe des Sauerstofftransportes zufällt und die auch die gleiche Guajakreaktion zu katalysieren vermögen. Inzwischen ist das „Leptomin" schon lange als unspezifische Peroxydase näher untersucht und als Häminferment identifiziert worden (u. a. THEORELL u. MAEHLY 1950, KEILIN u. HARTREE 1951). Auf die Biochemie dieser Peroxydase soll hier jedoch nicht eingegangen werden; wichtig ist ihre Fähigkeit, in situ wie in vitro mit Wasserstoffperoxyd, in geringem Maße auch mit Alkylperoxyden, verschiedenste organische und z. T. auch anorganische Substrate zu oxydieren. Zu diesen Substraten gehören unter Umständen Cytochrome (Übersichten bei HOFFMANN-OSTENHOF 1954, BURRIS 1960 und WOLF 1960). Da der Zutritt freien Sauerstoffes für einen Stofftransport nach den Ergebnissen meiner Versuche nicht notwendig erscheint und auch auf Grund der Intercellularenarmut der Phloeme kaum in ausreichendem Maße zu erwarten ist, während die Cyanidempfindlichkeit die Teilnahme einer anaeroben Gärung weniger wahrscheinlich macht, sollte der Peroxydase des Phloems unter diesem Aspekt wieder mehr Aufmerksamkeit geschenkt werden.

Während RACIBORSKI mit Guajak arbeitete, verwenden neuere Methoden mit Vorzug das bei seiner Oxydation noch auffälliger gefärbte Benzidin. Trotzdem gelingt es keineswegs immer, mit diesen histochemischen Nachweisverfahren in Quer- und Längsschnitten des Gewebes Peroxydasevorkommen genau zu lokalisieren, da meist Zellwände mit angefärbt werden (JENSEN 1955, VAN VLEET 1952 u. 1959). Reichliches Auftreten der Peroxydase ist für junge Pflanzenteile, für cambiale Gewebe und besonders für das Phloem in der ganzen Pflanze bekannt, ihr Vorkommen speziell in den Siebröhren, Geleitzellen und Phloemparenchymzellen wird von RACIBORSKI und VAN FLEET erwähnt.

Ziel der folgenden Versuche war es daher nur, die bisherigen Befunde durch möglichst genau lokalisierte Peroxydasenachweise zu vervollständigen und eventuell so einen Zusammenhang zur beobachteten Cyanidempfindlichkeit von Atmung und Stofftransport herzustellen.

**Material und Methodik.** Als Objekte wurden zunächst 22 verschiedene Pflanzenarten des Bonner Botanischen Gartens verwendet, die recht verschiedenen phylogenetischen Verwandtschaftsgruppen angehören: Pteridophyten, Gymnospermen und unter den Angiospermen Mono- und Dicotyledonen. Frischmaterial eignete sich wegen seiner Neigung zu unspezifischen „Oxydasereaktionen" weit weniger als Alkoholmaterial. Dieses durfte jedoch auch bei kaltem Fixieren nicht zu alt und bei warmem Fixieren nicht über 60° C mit dem Alkohol erwärmt worden sein, da sonst die Aktivität des Fermentes deutlich nachließ. Unter den zahlreichen in der histochemischen Literatur beschriebenen Abwandlungen des Peroxydasenachweisverfahrens bewährte sich eine sehr einfache am besten, die Benzidin-„Frisch"-Methode nach PRENANT, die hier deshalb als einzige angeführt sei (aus LINDERSTRØM-LANG u. HOLTER 1941). Als Reagentien dienten gesättigte und mit einigen Tropfen 50%iger Essigsäure angesäuerte wäßrige Benzidinlösung, sowie 0,3%ige, meist ebenfalls leicht essigsaure Wasserstoffperoxydlösung. Das Material wurde frisch oder fixiert in Längs- oder Querschnitte (Handschnitte) zerlegt, diese gelangten sofort in die Bäder. Die Schnitte zeigten in der Benzidinlösung nach 1—2 min eine gelbrötliche Färbung im Holz und wurden dann in die Peroxydlösung gelegt, wo sie sehr schnell die gewünschte tiefblaue und violettschwarze Farbe annahmen; nach kurzem Waschen in Wasser wurde beobachtet. Wichtig waren vor allem die Objekte, deren Plasmafärbung bzw. Färbung des Zellinhaltes einige Zeit erhalten blieb, während störende Wandfärbungen nur kurzzeitig und schwach in Erscheinung traten.

**Ergebnisse.** Die Mehrzahl der Objekte brachte auch nach Alkoholfixierung nur die schon lange bekannten diffusen Zellwandverfärbungen hervor, die eine genauere Lokalisation auf bestimmte Zellen nicht zulassen (vgl. VAN FLEET 1952). Eine deutliche Farbstoffanreicherung an den Zellinhalten, die nicht oder nur anfangs kurze Zeit von gefärbten Wänden beeinträchtigt wurden, zeigten am besten *Passiflora coerulea*, *Morus alba* und in geringerem Maße *Potentilla nepalensis*; bei *Pelargonium zonale* war die Benzidinblau- und Benzidinbraunfärbung wohl wegen des hohen Gerbstoffgehaltes zu wenig haltbar. *Passiflora coerulea* und z. T. *Morus alba* wurden daher als einzige weiter untersucht.

In Frischschnitte von *Passiflora* dringen die Reagenslösungen nur schlecht ein, die feinkörnige oder tropfenförmige Färbung, die nach VAN FLEET (1959) auf Anreicherung der Oxydationsprodukte des Benzidins an basophilen Bestandteilen der Zelle wie auch Nucleinsäuren zurückzuführen ist (die Kerne der Zellen blieben in meinen Versuchen normalerweise hell), wird zwar in den Phloemzellen erkennbar, doch bleiben viele Zellen ungefärbt und die getönten Wände stören die Beobachtung. Wässern oder alkalische Vorbehandlung führten auch bei alkoholfixiertem Material zu Auswaschung der offenbar leicht wasserlöslichen Peroxydase. Schnitte von Sproßstücken, die in kaltem Alkohol einige Tage fixiert worden waren, zeigten dagegen in Längs- und Querschnitten sehr gut lokalisierbare, auf Phloem und Cambium beschränkte Reaktion (Abb. 3 und 4). Unter den Phloemzellen hat das Phloemparenchym meist die höchste Aktivität, die in größeren oder feineren Körnern angereicherte Färbungen ergibt (Abb. 3). Die Geleitzellen

weisen eine mittlere und ziemlich gleichmäßige Aktivität auf, die Korngröße der Färbung wird aber auch hier von bisher unbekannten Faktoren bestimmt (Abb. 4). Nach Vergleichen mit der Kallosemenge der Platten kann auf ein besonders reichliches Peroxydasevorkommen in noch unfertigen sowie in jüngeren und vermutlich funktionstüchtigen Siebröhren geschlossen werden, während bei Siebröhren mit großen Kallose-

Abb. 3. Peroxydasereaktion in Phloemparenchymzellen von *Passiflora coerulea*. Längsschnitt, links in Cambiumnähe, rechts ausdifferenziert. Alkoholmaterial. Vergr. 1000 ×

kissen, die demzufolge wohl bereits nicht mehr ihre Transportfunktion ausübten, viel weniger und kleinere Körner zu beobachten waren (vgl. auch RACIBORSKI 1898b).

Setzt man zu allen Bädern, dem Benzidinbad, dem Peroxydbad und den Spülbädern Cyanid zu, so läßt sich die Peroxydasereaktion an Alkoholmaterial eindeutig hemmen, wobei die Hemmung davon unabhängig ist, ob die Bäder alle angesäuert worden sind oder nicht. Die Reaktion an sich verläuft ja am besten im schwach sauren Milieu. Cyanidhemmung gelingt jedoch nur bei ganz frischen Bädern, da sowohl im Benzidinbad als auch im Wasserstoffperoxydbad das Cyanid nach kurzer Zeit zerstört oder abgedampft ist. Bei einer Cyanidkonzentration

von $10^{-2}$ m in allen Lösungen zeigten sich auch nach längerer Zeit nur Spuren einer Reaktion, bei $10^{-3}$ m war diese nicht mehr so vollständig gehemmt, die Anfärbung aber noch stark verlangsamt. Ein deutlicher Unterschied in der Reaktionsgeschwindigkeit ließ sich bis $5 \times 10^{-4}$ m verfolgen, bei $1 \times 10^{-4}$ m KCN (auf $p_H$ 5—6 gebracht) dagegen war er verschwunden. Die Hemmbarkeit durch Cyanid ist einerseits die beste

Abb. 4. Peroxydasereaktion in Siebröhren und Geleitzellen von *Passiflora coerulea*, Längsschnitt. *p* Siebplatte; *Gz* Geleitzelle, diese links im Seitenriß und mit grobkörniger Färbung, rechts in Aufsicht mit feinkörniger Färbung. Alkoholmaterial, Vergr. 1000 ×

Sicherung gegen Artefakte, sind doch die Peroxydasen als Häminfermente ähnlich empfindlich wie Cytochromoxydase; andererseits liegt in ihrer Cyanidempfindlichkeit auch eine ihrer möglichen Grenzen für die Bedeutung beim Stofftransport, nämlich für wenig empfindliche Objekte, wie es ja die *Pelargonium*-Blattnerven und *Passiflora* (darüber soll gesondert berichtet werden) zu sein scheinen. Die zweite Grenze ihrer Wirksamkeit ist wahrscheinlich die im Gewebe verfügbare Menge an Wasserstoffperoxyd. Daß $H_2O_2$ trotz seiner Giftigkeit in geringem Maße im Stoffwechsel auftritt, wird heute angenommen, doch scheint

sein Vorkommen überwiegend durch die Reaktion gewisser Oxydasen mit Luftsauerstoff bedingt zu sein. Mit der grundsätzlichen Möglichkeit seines Einsatzes auch bei der Atmung bzw. bei gerade für den Stofftransport notwendigen Umsetzungen muß jedoch immerhin gerechnet werden.

## Besprechung der Ergebnisse

Da in der vorliegenden Arbeit die Möglichkeiten einer Sauerstoff- und Energieversorgung des Phloems behandelt werden, Fragen, die im Bereich des Stoff- und Energiewechsels eine zentrale Rolle spielen, sei auch der eigentlichen Besprechung der Ergebnisse zunächst eine Übersicht des bisher über den Stoffwechsel der Leitgewebe bzw. speziell des Phloems Bekannten vorausgeschickt.

Nach unserem heutigen Kenntnisstand liegen die Kohlenhydrate, die uns als mengenmäßig größter Anteil der Transportstoffe hier am meisten interessieren sollen, normalerweise im Blatt in recht verschiedenartiger Form vor und werden vermutlich erst bei ihrer Einführung in die Siebröhren aus Monosacchariden in die Transportform der Saccharose umgewandelt. Nach KURSANOV u. PAVLINOVA (1952) sowie KURSANOV (1961) geschieht das bei *Beta vulgaris* überwiegend in der Blattspreite. Während Gewebeextrakte auch aus dem Phloem größere Mengen an Glucose und Fructose enthalten, scheinen innerhalb der Siebröhren nur Saccharose und in geringer Menge einige andere Oligosaccharide vorhanden zu sein (ZIMMERMANN 1957a, b, 1958a, b, MEYER-MEVIUS 1959, ZIEGLER u. MITTLER 1959). YIN (1945), WANNER (1952), BAUER (1953) und ZIEGLER (1956) beschreiben reichliches Vorkommen von Phosphatasen im Phloem, ein Befund, der sich mit ihrer histochemischen Methodik leicht reproduzieren läßt, und glauben daher, in den Geleit- und Phloemparenchymzellen Orte starker Zuckerumwandlungen für den Ferntransport annehmen zu können, obwohl dies etwa für den Blattstiel, wo reine Leitungsvorgänge überwiegen dürften, weniger einleuchtend erscheint.

Über die Umsetzungen der einmal gebildeten Saccharose berichtet TURKINA (1959). Nach Fütterung radioaktiver Saccharose, allerdings durch Einlegen isolierter und daher wohl kaum transportierender Leitbündel in die Zuckerlösung, fand sie die meisten Säuren markiert vor, so daß mit einem normalen Atmungssystem gerechnet werden konnte, wie das auch aus den Gaswechselmessungen früherer Autoren (KURSANOV u. TURKINA 1952, WILLENBRINK 1957, ZIEGLER 1958) und meinen eigenen hervorgeht. Den Anteil der Saccharose, der auf diese Weise veratmet und für den Aufbau eigener Substanzen wie z. B. Aminosäuren verbraucht wird, bezeichnet TURKINA als klein im Vergleich zur gesamten wandernden Menge; genauere Angaben sind nach ihrer Versuchsanstellung allerdings nicht möglich. Zu einem ähnlichen Schluß kommt CANNY (1960) bei Untersuchungen tatsächlich transportierender Blattstiele an der intakten Pflanze. Sofern seine Berechnungen nicht durch experimentelle Fehlerquellen zu stark belastet sind, läge die $CO_2$-Abgabe der Atmung oder Gärung des Phloemgewebes hier sogar erheblich niedriger als die der Restgewebe des Blattstieles, was den bisherigen Anschauungen in hohem Maße widerspricht (KURSANOV 1952, KURSANOV u. TURKINA 1952a u. b, WILLENBRINK 1957, ZIEGLER 1958, KURSANOV, PAVLINOVA u. AFANASEVA 1959, KURSANOV 1961). Der Vorteil der Versuchsanordnung CANNYs ist das Vermeiden eines Wundeffektes; es wäre immerhin möglich, daß Leitgewebe auf einen Wundreiz viel stärker reagieren als ausdifferenzierte Parenchyme eines Blattstieles. Der

Gehalt des Phloems an gewissen Gärungsfermenten wurde von WANNER (1953) leider nur an Zapfsäften von Baumrinden und dementsprechend mit unvollständigem Erfolg untersucht. Es ist ja auch nicht zu erwarten, daß bei Zapfsäften das Plasma der Siebröhren in ausreichender Menge mit zur Untersuchung gelangt. Gerade die wichtigen der von WANNER nicht gefundenen Fermente konnten jedoch KURSANOV, PAVLINOVA u. AFANASEVA wenigstens in den Extrakten ganzer Leitbündel in reichem Maße nachweisen, obwohl auch damit über die Siebröhren selbst nichts Sicheres gesagt ist. Bis heute ist also wohl einiges über biochemische Umsetzungen im Phloem als Gesamtgewebe bekannt, die ein normales Gärungs- und Atmungssystem andeuten, die genaueren quantitativen Angaben über den tatsächlichen Energiebedarf transportierenden Phloems sind aber noch schwer zu beurteilen. Dafür, daß die Stoffwechselenergie nicht nur für die Erhaltung und den Aufbau des Gewebes, sondern auch zusätzlich für den Stofftransport in den Siebröhren gebraucht wird, liegen bisher neben den Hemmversuchen mit Fermentgiften kaum geeignete Anhaltspunkte vor.

Betrachten wir unter diesem Aspekt eines mehr oder weniger lebhaften Stoffwechsels in den Phloemen, der nach den Gaswechselmessungen an isolierten Gewebestücken den Charakter einer weitgehend normalen Atmung trägt, die Anaerobioseversuche bei *Pelargonium*, so erscheint die beobachtete Unabhängigkeit des Transportes von der Sauerstoffzufuhr als Widerspruch. Dies gilt um so mehr, als durch die Versuche an freigelegten Leitbündeln des Blattstieles und an der Blattspreite auch die Möglichkeit einer Zuwanderung gasförmigen Sauerstoffes in der Längsrichtung der Leitbahnen ausgeschlossen werden konnte. Selbst wenn im Gewebe noch Sauerstoffreste vorhanden gewesen wären, so hätte sich eine Abhängigkeit des Fluoresceintransportes vom Luftsauerstoff immerhin in einer leichten quantitativen Transportverminderung bei den Versuchen gegenüber den Kontrollen äußern müssen. KURSANOV (1954) vermutet zwar einen Beitrag zur Sauerstoffversorgung des Phloems an unzugänglichen Stellen durch die Assimilation benachbarter grüner Gewebe; dies kann jedoch nicht für tiefer im Innern eines Stengels gelegene Leitbündel gelten und wurde in den hier behandelten Versuchen schon durch die allgemeine Verdunklung ausgeschlossen.

Mit der Fähigkeit eines Gewebes zur Atmung ist im allgemeinen auch die zu einer anaeroben Gärung verbunden, da der glykolytische Abbau der Zucker ohnehin ein Teil des gesamten Atmungsablaufes ist. Die Zahl der Objekte, die unter anaeroben Bedingungen eine größere Menge an Kohlenhydraten einsetzen können als im aeroben Milieu und somit auch genügend mit Energie versorgt sind, scheint aber nach neueren Untersuchungen nicht sehr groß zu sein (TURNER 1960). Während die RQ-Werte des isolierten Phloems von *Heracleum sphondylium* bei normalen Atmungsverhältnissen entsprechend den Befunden von ZIEGLER (1958) an *H. mantegazzianum* leicht unter 1 lagen, wurde tatsächlich in Anaerobiose eine lebhafte, bis über 26 Std hinweg nahezu unveränderte Gärung

gemessen. Eine Fähigkeit zu gesteigertem Umsatz, die vielleicht auch einen echten Pasteureffekt, also einen erhöhten Einsatz von Kohlenhydraten für alkoholische oder Milchsäuregärung einschließt, konnte ebenfalls nachgewiesen werden, doch handelt es sich noch nicht um Werte, die eindeutige Aussagen erlauben (TURNER 1960); hierfür fehlen auch biochemische Analysen (vgl. etwa BARKER u. EL SAIFI 1952).

Nach unseren Ergebnissen wäre also zwar das Phloemgewebe in der Lage, einen Teil seines Energiebedarfes aus einer anaeroben Gärung zu gewinnen, doch wird dadurch die hohe Cyanidempfindlichkeit des Transportes bei den Blattstielversuchen an *Pelargonium* keineswegs verständlich. Deshalb wurden auch Atmung und anaerobe Gärung bei *Heracleum sphondylium* auf diese Cyanidempfindlichkeit geprüft. Die Sauerstoffaufnahme begann bei $10^{-3}$ m KCN deutlich abzusinken (vgl. ZIEGLER 1958), also in ähnlicher Größenordnung wie der Transport in *Pelargonium*-Blattstielen, die Gärung erst bei $10^{-2}$ m, was etwa den Angaben von WARBURG (1925 u. 1948) für die Hefegärung entsprach.

Die relativ hohe Cyanidempfindlichkeit des Stofftransportes von *Pelargonium* und der Atmung der *Heracleum*-Phloembündel deutet daher doch auf eine Mitwirkung von Schwermetallfermenten hin, und darum sollte versucht werden, mit Hilfe von Cyanid als einem der am besten bekannten und am leichtesten eindringenden Atmungsinhibitoren einen weiteren Einblick in die Energieabhängigkeit des Transportes zu gewinnen. Daß die Transporthemmung durch Atmungsgifte reversibel ist, konnte schon WILLENBRINK (1957) bei *Pelargonium* beweisen und wurde in einer kleinen Versuchsgruppe dieser Arbeit erneut bestätigt.

An der Blattspreite von *Pelargonium zonale* mußten um eine Zehnerpotenz höhere Cyanidkonzentrationen angewendet werden als an den Blattstielleitbündeln, um eine einigermaßen zuverlässige Transporthemmung zu erreichen, wobei die Wirkung des Blausäuregases auf die Leitbahn außerhalb der geschützten Fluoresceinzugabestelle größer war als die einer mit Fluorescein gemeinsamen Lösung unter dem Pflaster. Es kann daraus geschlossen werden, daß Cyanid den Aufnahmemechanismus selbst weniger zu beeinträchtigen vermochte als den des Transportes. Veränderungen der Aufnahme durch die höheren $p_H$-Werte einer gemeinsamen Fluorescein- und Cyanidlösung (vgl. DÖHRING 1935) wurden dabei zwar nicht erfaßt, auch bei Verwendung gasförmiger Blausäure war jedoch stets in der Nähe der Fluoresceinzugabestelle eine starke Fluorescenz in den Siebröhren zu beobachten. Auf den steilen Fluorescenzgradienten entlang der Siebröhren, der seinerseits wiederum für eine Stauung des Farbstoffes, d. h. für eine Transporthemmung, aber gegen eine Aufnahmehemmung sprach, war schon an früherer Stelle hingewiesen worden.

Unter Berücksichtigung einiger Empfindlichkeitsunterschiede kann also auch nach diesen Cyanidversuchen gerade für den Transport eine Beteiligung schwermetallhaltiger Fermente angenommen werden. Da Luftsauerstoff nicht notwendigerweise hinzuzutreten braucht, scheint es sich trotz des Vorkommens von Mitochondrien im Siebröhrenplasma nicht um Cytochromoxydase oder um ähnliche Oxydasen zu handeln, und es liegt daher sehr nahe, an einen Zustrom von Sauerstoff in irgendeiner gebundenen Form innerhalb des Phloems zu denken, der dann am Einsatzort in den Oxydationsprozeß einer Sauerstoffatmung mit einbezogen würde und der an isoliertem Gewebe durch freien Luftsauerstoff ersetzt werden könnte. RACIBORSKIS Vermutung (1898) der Tätigkeit des „Leptomins" als eines Sauerstoffträgers wie im tierischen Blut hat sich jedoch bisher nicht bestätigen lassen und setzt auch eine fortlaufende Atmung freien Sauerstoffes aus der Luft voraus. Daß eine solche nicht unbedingt notwendig ist, zeigen meine Anaerobioseversuche an der Blattspreite. RACIBORSKIS „Leptomin" ist inzwischen als unspezifische Peroxydase näher untersucht worden, aber man hat für ihr reichliches Vorkommen in allen Phloemgeweben, auch denen alter Pflanzenteile, bisher noch keine Erklärung gefunden. Durch ihre Rolle bei der Ligninbildung (FREUDENBERG u. a. 1952, FREUDENBERG u. SAKAKIBARA 1959, SIEGEL 1953 u. 1954) wird ein häufiges Auftreten der Peroxydase im xylemseitigen Cambium verständlich. Andere Aufgaben dieses Fermentes wie auch die im Wuchsstoffhaushalt gehen aus den Untersuchungen von JENSEN (1955) und VAN FLEET (1959) hervor, die auf eine besonders hohe Aktivität in embryonalen und wieder embryonal gewordenen Geweben hinweisen; für das Phloem kommen diese Deutungen jedoch alle nicht in Frage. Während sich die experimentellen Untersuchungen in dieser Arbeit im wesentlichen auf histochemische Nachweise beschränkten (vgl. auch RACIBORSKI und VAN FLEET), müssen bei der Erörterung der möglichen Bedeutung der Peroxydase beim Stofftransport auch einige quantitative Faktoren berücksichtigt werden. Peroxydase ist cyanidempfindlich wie Cytochromoxydase, was auch bei den histochemischen Proben gezeigt werden konnte. Mit einem nur unvollständigen Eindringen der Blausäure in die Blattnerven von *Pelargonium* ist, wie schon gesagt, zu rechnen. Außerdem könnte aber in den Blattnerven die Stoffaufnahme den reinen Transportvorgang teilweise überdecken und daher etwas andere Stoffwechselverhältnisse vortäuschen. Neben der ungleichen Cyanidempfindlichkeit verschiedener Objekte muß als weiterer und sicherlich noch wichtigerer begrenzender Faktor für eine allgemeine Beteiligung der Peroxydase die zur Verfügung stehende Menge an Wasserstoffperoxyd angeführt werden. Nach den bisherigen biochemischen Untersuchungen ist die in den Pflanzen verbreitete Peroxydase zwar nicht substratspezifisch, aber ziemlich streng

spezifisch auf die Mitwirkung von Wasserstoffperoxyd eingestellt (HOFFMANN-OSTENHOF 1954, BURRIS 1960, WOLF 1960). Nur einige Alkylperoxyde, die aber in den Zellen ebenso giftig wirken wie $H_2O_2$ selbst, können in weit geringerem Maße verwendet werden. Die für unsere Erwägungen wichtige Oxydation von Cytochromen setzt also ansehnliche Mengen an Wasserstoffperoxyd voraus.

Verwendet man die $CO_2$-Abgabewerte von CANNY (1960) mit 200 $\mu$l/g Frischgewicht und Stunde, setzt den RQ gleich 1 und rechnet für ein Molekül $O_2$ als Äquivalent zwei Moleküle $H_2O_2$ so erhält man den Verbrauchswert von 18 $\mu$Mol = 0,6 mg $H_2O_2$ je Gramm Frischgewicht und Stunde. Sollte wirklich mit Hilfe des Peroxyds eine ausgeglichene Atmung stattfinden, und berücksichtigt man den Konzentrationsabfall auf dem Wege eines Ferntransportes aus den Blättern, so müßte in den blattnäheren Bereichen die Peroxydkonzentration wohl noch höher angesetzt werden und erreichte dann schnell Werte von über 0,1% des Frischgewichtes, natürlich immer noch vorausgesetzt, daß alles $H_2O_2$ nur für diese Atmung verwendet würde.

Auch von einer „Peroxydaseatmung" ist also nach dem heutigen Kenntnisstand kein sehr großer Beitrag zu erwarten, zumal das Peroxyd in meinen Versuchen auch nur aus Reserven des Blattes hätte in den Leitbündeln zuwandern können. Über andere Sauerstoffträger in der Pflanze ist aber seit RACIBORSKIS Annahme nichts mehr bekannt geworden.

Wenn wir also auch nach den Befunden dieser Arbeit mit einem direkt oder über die Erhaltung der Feinstrukturen in den Siebröhren indirekt energieabhängigen Transport rechnen dürfen, so kann über die Form der Energiebereitstellung und über den Mechanismus selbst nichts Näheres ausgesagt werden, als daß er vom Luftsauerstoff unabhängig erscheint, während seine Empfindlichkeit gegenüber Blausäure auf schwermetallabhängige Vorgänge hinweist. Über Versuche zur eventuellen Mitwirkung von Adenosintriphosphat als Energieträger beim Transport in den Siebröhren, die sich hier natürlich der Überlegung anbietet, soll in einer gesonderten Veröffentlichung berichtet werden.

## Zusammenfassung

Da heute allgemein eine Regelung des Stofftransportes in den Siebröhren durch Stoffwechselvorgänge angenommen wird, sollte in der vorliegenden Arbeit der Energiestoffwechsel des Phloems und insbesondere die Bedeutung einer Sauerstoffversorgung und Sauerstoffatmung für ein transportierendes Phloem untersucht werden.

1. Weder durch Anaerobiose am freigelegten Zentralleitbündel des Blattstieles, noch durch Sauerstoffentzug an der verdunkelten Blattspreite von *Pelargonium zonale* konnte ein Fluoresceintransport aus der Spreite durch den Stiel hindurch gehemmt oder beeinträchtigt werden. Der Luftsauerstoff scheint also für den Stofftransport in den Siebröhren

keine Rolle zu spielen, was mit der Beobachtung übereinstimmt, daß die Leitbündel normalerweise ohne alle Intercellularen tief im Gewebe eingebettet liegen.

2. Als möglicher Ersatz der oxydativen Atmung auch in situ konnte an den isolierten Phloembündeln von *Heracleum sphondylium* die Fähigkeit zu einer lebhaften anaeroben Gärung über viele Stunden nachgewiesen werden. Durch 0,1 m Saccharose ließ sich die Gärung anregen, durch Cyanid ab $10^{-2}$ m deutlich hemmen. Bei Sauerstoffzutritt findet eine normale Atmung statt, so daß mit dem Vorhandensein eines vollständigen Atmungssystemes gerechnet werden muß.

3. Blausäure hemmte den Transport bei lokaler Anwendung am freigelegten Zentralleitbündel des Blattstieles von *Pelargonium* schon durch Verdampfen aus 1 bis $2 \times 10^{-3}$ m Cyanidlösung sicher und reversibel, bei Anwendung an den Nerven der Blattspreite erst über $2 \times 10^{-2}$ m.

4. Da also der Transport nicht vom Luftsauerstoff abhängig, wohl aber cyanidempfindlich ist, wurde der bekannten und gerade im Phloem reichlich vertretenen Peroxydase (einem Schwermetallferment) neue Aufmerksamkeit geschenkt. Mit einer Benzidin-$H_2O_2$-Methode konnte in den Sieb-, Geleit- und Phloemparenchymzellen von *Passiflora coerulea* und *Morus alba* eine hohe Peroxydaseaktivität lokalisiert nachgewiesen werden. Die Reaktion ist cyanidempfindlich; ein Peroxyd-Peroxydasesystem könnte daher auch an cyanidempfindlichen, aber weitgehend vom Luftsauerstoff unabhängigen Atmungsprozessen beteiligt sein, sofern auf anderem Wege genügend Peroxyde entstünden.

5. Nach den hier aufgeführten Ergebnissen scheint daher der Energiestoffwechsel des Phloems durch eine Reihe von Besonderheiten ausgezeichnet zu sein. Obwohl Luftsauerstoff kaum an den Umsetzungen beteiligt sein dürfte, läßt sich ein voll wirksames Atmungssystem nachweisen. Für die Mitwirkung schwermetallhaltiger Fermente beim Transport spricht die Empfindlichkeit gegenüber spezifischen Giften. Anaerobe Gärung und eine Atmung mit Hilfe gebundenen und im Phloem mittransportierten Sauerstoffes über ein Peroxydasesystem oder der Transport energiereicher Verbindungen sind Möglichkeiten der Energieversorgung, denen eine gewisse Bedeutung für den Stofftransport zufallen könnte.

## Summary

It is now commonly supposed that transport in sieve tubes is regulated by metabolic processes. In the present paper the energetic metabolism of the phloem, and in particular the importance of oxygen supply and aerobic respiration for the transport mechanism in this tissue, is investigated.

1. Transport of fluorescein from the lamina through the petiole of *Pelargonium zonale* could neither be delayed by anaerobiosis of the exposed central bundle nor by depriving the darkened lamina of oxygen. Oxygen, therefore, seems to play

no part in transport through sieve tubes. This agrees with the fact that the bundles lack intercellular spaces and are generally deeply embedded in tissues.

2. An intensive anaerobic fermentation, lasting for many hours and acting as a possible substitute for oxydative respiration, was demonstrated using isolated phloem tissue of *Heracleum sphondylium*. Fermentation was stimulated by 0.1 molar sucrose but was markedly inhibited by cyanide concentrations of $10^{-2}$ M or greater. Since normal respiration was observed in the presence of oxygen, the presence of a complete respiratory system must be assumed.

3. Hydrocyanic acid gas, distilled from a 1 to $2 \times 10^{-3}$ molar solution of cyanide, reliably and reversibly inhibited transport after local application at the exposed central bundles of *Pelargonium* petioles; yet a $2 \times 10^{-2}$ M or stronger solution was required to cause inhibition when applied to the lamina.

4. Since transport did not depend on oxygen supply, but was nevertheless sensitive to cyanide, the localization of peroxidase (a heavy metal enzyme), which occurs in considerable amounts in the phloem, had to be considered again. Using a benzidine-$H_2O_2$ method, a high activity of peroxidase could be detected, localized in sieve tubes, companion cells, and phloem parenchyma cells of *Passiflora coerulea* and *Morus alba*. The reaction was sensitive to cyanide, suggesting, therefore, that a peroxide-peroxidase system might take part in a cyanide-sensitive respiration. Such a reaction should be almost independent of oxygen, provided that peroxides are formed in sufficient quantities by other processes.

5. The results reported indicate that energy metabolism in the phloem may be marked by some peculiarities. Although oxygen from the air might not take part in the metabolic processes, the presence of a complete respiratory system is evident. The action of heavy-metal containing enzymes in transport is suggested by the sensitiveness of the system to specific poisons. Anaerobic fermentation and respiration with the help of a peroxidase system, which uses bound oxygen transported in the phloem itself, or the transport of energy-rich compounds are possibilities of the energy supply, which might have a certain importance in the transport mechanism.

## Literatur

ARISZ, W. H.: Transport of organic compounds. Ann. Rev. Plant Physiol. **3**, 109—130 (1952).

BARKER, J., and A. F. EL SAIFI: Studies in the respiratory and carbohydrate metabolism of plant tissues. I. and II. Proc. roy. Soc. B **140**, 362—403 (1952).

BAUER, L.: Zur Frage der Stoffbewegungen in der Pflanze. Planta (Berl.) **42**, 367—451 (1953).

BEER, M.: Zit. nach ZIEGLER 1960b, Proc. IX. Internat. Bot. Congr. **2**, 26 (1959).

BURRIS, R. H.: Hydroperoxidases (peroxidases and catalases). In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. XII/1, S. 365—400. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.

BUVAT, R.: Observations sur les ultrastructures du cytoplasme au cours de la différenciation des cellules criblées de *Cucurbita pepo* L. C. R. Acad. Sci. (Paris) **250**, 1528—1530 (1960).

CANNY, M. J.: The breakdown of sucrose during translocation. Ann. Botany **24**, 330—344 (1960).

CURTIS, O. F.: Studies on solute translocation in plants. Experiments indicating that translocation is dependent on the activity of living cells. Amer. J. Bot. **16**, 154—168 (1929).

DÖHRING, H.: Versuche über die Aufnahme fluoreszierender Stoffe in lebende Pflanzenzellen. Ber. dtsch. bot. Ges. **53**, 415—437 (1935).

Felix, K., M. Decker u. L. Roka: Dehydrogenaseaktivität der Mitochondrien verschiedener Organe. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **294**, 79—85 (1953).

Fleet, D. S. van: Histochemical localization of enzymes in vascular plants. Bot. Rev. **18**, 354—398 (1952).

— Analysis of the histochemical localization of peroxidase related to the differentiation of plant tissues. Canad. J. Bot. **37**, 449—458 (1959).

Freudenberg, K., H. Reznik, H. Boesenberg u. D. Rasenack: Das an der Verholzung beteiligte Fermentsystem. Chem. Ber. **85**, 641—647 (1952).

—, u. A. Sakakibara: Weitere Zwischenprodukte der Bildung des Lignins. Ann. Chem. **623**, 129—137 (1959).

Hackett, D. P.: Respiratory Inhibitors. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. XII/2, S. 23—41. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.

Hoffmann-Ostenhof, O.: Enzymologie. Wien: Springer 1954.

Huber, B.: Anatomical and physiological investigations on food translocation in trees. In K. V. Thimann, Cabot Foundation Symp., p. 367—379. New York:, Ronald Press 1958.

James, W. O.: The use of respiratory inhibitors. Ann. Rev. Plant Physiol. **4** 59—90 (1953).

Jensen, A.: The histochemical localization of peroxidase in roots and its induction by indoleacetic acid. Plant Physiol. **30**, 426—432 (1955).

Keilin, D., and E. F. Hartree: Purification of horseradish peroxidase and comparison of its properties with those of catalase and methaemoglobin. Biochem. J. **49**, 88—104 (1951).

Kendall, W. A.: Effect of certain metabolic inhibitors on translocation of $^{32}P$ in bean plants. Plant Physiol. **30**, 347—350 (1955).

Kollmann, R.: Untersuchungen über das Protoplasma der Siebröhren von *Passiflora coerulea*. II. Elektronenoptische Untersuchungen. Planta (Berl.) **55**, 67—107 (1960).

Kursanov, A. L.: Der Transport der organischen Substanzen in der Pflanze. [Russisch.] Bot. Ž. **37**, 585—593 (1952).

— Circulation des matières organiques dans la plante et action du système radiculaire. Essais de Bot. I, Acad. Sci. de l'URSS, soc. bot. de l'URSS Moscou-Léningrad 1954.

— Der Transport organischer Stoffe in den Pflanzen. Endeavour **20**, 19—25 (1961).

—, i O. A. Pavlinova: Zur Frage über den Ort der Saccharosesynthese in der Zuckerrübenpflanze. [Russisch.] Biochimija **17**, 4, 446—455 (1952).

— — i T. P. Afanaseva: Glycolyseenzyme der Leitgewebe bei Zuckerrübenpflanzen [Russisch.] Fiziol. Rastenij **6**, 286—296 (1959).

—, i M. V. Turkina: Die Atmung der Leitbündel. [Russisch.] Dokl. Akad. Nauk SSSR. **84**, 1073—1076 (1952a).

— — Die Atmung der leitenden Gewebe und der Transport der Saccharose. [Russisch.] Dokl. Akad. Nauk SSSR. **85**, 649—652 (1952b).

Linderstrøm-Lang, K., u. H. Holter: Die enzymatische Histochemie. In E. Bamann u. K. Myrbäck, Methoden der Fermentforschung, S. 1132—1162. Leipzig 1941.

Mason, T. G., and E. J. Maskell: Studies on the transport of carbohydrates in the cotton plant. II. The factors determining the rate and the direction of movement of sugars. Ann. Botany **42**, 571—636 (1928).

—, and E. Phillis: Further studies on transport in the cotton plant. V. Oxygen supply and the activation of diffusion. Ann. Botany **50**, 455—500 (1936).

— — The migration of solutes. Bot. Rev. **3**, 47—71 (1937).

— — Some comments on the mechanism of phloem transport. Plant Physiol. **16**, 399—404 (1941).

Mc GIVERN, M. J. Sister: Mitochondria and plastids in sieve tube cells. Amer. J. Bot. **44**, 37—48 (1957).

MEYER-MEVIUS, U.: Vorkommen und Transport von Kohlenhydraten und Stickstoffverbindungen in den pflanzlichen Leitungsbahnen. Flora (Jena) **147**, 553—594 (1959).

MOORE, W., and J. J. WILLIAMAN: Studies in greenhouse fumigation with hydrocyanic acid: physiological effects on the plant. J. agric. Res. **11**, 319—338 (1917).

MÜNCH, E.: Die Stoffbewegungen in der Pflanze. Jena: Gustav Fischer 1930.

— Die Durchlässigkeit der Siebröhren für Druckströmungen. Flora (Jena) **136**, 223—262 (1943).

NELSON, C. D., and P. R. GORHAM: Uptake and translocation of $C^{14}$-labelled sugars applied to primary leaves of soybean seedlings. Canad. J. Bot. **35**, 339—347 (1957a).

— — Translocation of radioactive sugars in the stems of soybean seedlings. Canad. J. Bot. **35**, 703—713 (1957b).

PÄTAU, K.: Zur statistischen Sicherung von Messungsreihen (eine neue t-Tafel). Biol. Zbl. **63**, 152—168 (1943).

PALMQUIST, E. M.: The simultaneous movement of carbohydrates and fluorescein in opposite directions in the phloem. Amer. J. Bot. **25**, 97—105 (1938).

RACIBORSKI, M.: Ein Inhaltskörper des Leptoms. Ber. dtsch. bot. Ges. **16**, 52—63 (1898a).

— Weitere Mitteilungen über das Leptomin. Ber. dtsch. bot. Ges. **16**, 119—123 (1898b).

ROBBIE, W. A.: Use of cyanide in tissue respiration studies. In V. R. POTTER, Methods in medical research, vol. 1, p. 307—316. 1948.

SCHUMACHER, W.: Untersuchungen über die Lokalisation der Stoffwanderung in den Leitbündeln höherer Pflanzen. Jb. wiss. Bot. **73**, 770—823 (1930).

— Untersuchungen über die Wanderung des Fluoresceins in den Siebröhren. Jb. wiss. Bot. **77**, 685—732 (1933).

— Weitere Untersuchungen über die Wanderung von Farbstoffen in den Siebröhren. Jb. wiss. Bot. **85**, 422—449 (1937).

— Zur Frage nach den Stoffbewegungen im Pflanzenkörper. Naturwissenschaften **34**, 176—179 (1947).

—, u. R. KOLLMANN: Zur Anatomie des Siebröhrenplasmas bei *Passiflora coerulea*. Ber. dtsch. bot. Ges. **72**, 176—179 (1959).

SCHWARZ, W.: Die Wellung der Gefäßbündel bei *Heracleum*. Planta (Berl.) **2**, 19—26 (1926).

SIEGEL, S. M.: On the biosynthesis of lignins. Physiol. Plantarum (Cph.) **6**, 134—139 (1953).

— Studies on the biosynthesis of lignins. Physiol. Plantarum (Cph.) **7**, 41—50 (1954).

SMALL, J.: Technique for the observation of protoplasmic streaming in sieve tubes. New Phytologist **38**, 176—177 (1939).

THEORELL, H., u. A. MAEHLY: Untersuchungen an künstlichen Peroxydasen. Acta chem. Scand. **4**, 422—434 (1950).

TROLL, W.: Über Leitbündelisolierung in achsenartigen Organen. Planta (Berl.) **36**, 402—410 (1949).

TURKINA, M. V.: Die Umwandlung der Saccharose in den Fibrovasculärbündeln der Zuckerrübe. [Russisch.] Fiziol. Rastenij **6**, 709—718 (1959).

— i I. M. DUBININA: Einige Besonderheiten der Atmung der Leitbündel. [Russisch.] Dokl. Akad. Nauk SSSR. **95**, 199—202 (1953).

Turner, J. S.: Fermentation in higher plants; its relation to respiration; the Pasteur effect. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. XII/2, S. 42—87. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.

Wanner, H.: Phosphataseverteilung und Kohlenhydrattransport in der Pflanze. Planta (Berl.) **41**, 190—194 (1952).

— Enzyme der Glykolyse im Phloemsaft. Ber. schweiz. bot. Ges. **63**, 201—212 (1953).

Warburg, O.: Über die Wirkung der Blausäure auf die alkoholische Gärung. Biochem. Z. **165**, 196—202 (1925).

— Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten. Berlin: Saenger 1948.

Willenbrink, J.: Über die Hemmung des Stofftransports in den Siebröhren durch lokale Inaktivierung verschiedener Atmungsenzyme. Planta (Berl.) **48**, 269—342 (1957).

Wolf, J.: Einleitung und Übersicht. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. XII/1, S. LXIII—CCLXXX. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.

Yin, H. C.: A histochemical study of the distribution of phosphatase in plant tissues. New Phytologist **44**, 191—195 (1945).

Ziegler, H.: Untersuchungen über die Leitung und Sekretion der Assimilate. Planta (Berl.) **47**, 447—500 (1956).

— Über die Atmung und den Stofftransport in den isolierten Leitbündeln der Blattstiele von *Heracleum mantegazzianum*. Planta (Berl.) **51**, 186—200 (1958).

— Untersuchungen über die Feinstruktur des Phloems. I. Mitt. Die Siebplatten bei *Heracleum mantegazzianum*. Planta (Berl.) **55**, 1—12 (1960a).

— Wasserumsatz und Stoffbewegungen. Fortschr. Bot. **22**, 164—177 (1960b).

—, u. T. E. Mittler: Über den Zuckergehalt der Siebröhren- bzw. Siebzellensäfte von *Heracleum mantegazzianum* und *Picea abies*. Z. Naturforsch. **14b**, 278—281 (1959).

Zimmermann, M. H.: Translocation of organic substances in trees. I. The nature of the sugars in the sieve tube exudate of trees. Plant Physiol. **32**, 288—291 (1957a).

— Translocation of organic substances in trees. II. On the translocation mechanism in the phloem of white ash *(Fraxinus americana* L.*)* Plant Physiol. **32**, 399—404 (1957b).

— Translocation of organic substances in the phloem of trees. In K. V. Thimann, The Physiology of Forest Trees (Cabot Foundation Symp.), p. 381—400. New York: Ronald Press 1958a.

— Translocation of organic substances in trees. III. The removal of sugars from the sieve tubes in the white ash *(Fraxinus americana* L.*)* Plant Physiol. **33**, 213—217 (1958b).

Dr. Wolfram Ullrich, Botanisches Institut der Universität, Bonn, Meckenheimer Allee 170

Planta 57, 430—443 (1961)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Bonn

# WEITERE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN GASWECHSEL VON BLÜTENBLÄTTERN*

Von

HERMANN FISCHER

Mit 2 Textabbildungen

*(Eingegangen am 13. Juli 1961)*

## Einleitung

Während der Blütezeit treten in den Organen der Blüte stoffliche Veränderungen ein, die besonders bei solchen mit kurzer Lebensdauer sehr rasch aufeinander folgen. Da sich die Entwicklungsstadien oft am äußeren Erscheinungsbild der Blüten gut erkennen lassen und bei vielen ephemeren Blüten mit bestimmten Tageszeiten zusammenfallen, muß der Stoffwechsel in den aufeinanderfolgenden Stadien leicht zu erfassen sein; aus diesem Grunde haben wir in den zurückliegenden Jahren den Gaswechsel von Blüten einer Anzahl von Pflanzen, vor allem solcher, die nur eine bestimmte und kurze Blühdauer haben, mit dem Hauptziel studiert, eventuell qualitative Veränderungen im Gaswechsel nachzuweisen. Von den untersuchten Blüten zeigte nur *Hydrocleis nymphoides* eine deutliche RQ-Veränderung beim Verblühen (FISCHER 1958), die auf eine Veränderung des Atmungssubstrates deuten könnte. Bei anderen Blüten ließ sich auch in einer größeren Anzahl von Versuchen nichts ähnliches nachweisen.

Das so erarbeitete Versuchsmaterial gestattet aber eine Auswertung nach der quantitativen Seite, die von Interesse sein dürfte, weil sich nicht viele Daten über den Gaswechsel von Blütenblättern, während sie verschiedene Entwicklungsstadien durchlaufen, in der Literatur finden. Es sollen daher im folgenden die Ergebnisse zusammengefaßt werden, soweit sie ausreichen, um den Gaswechsel während des Blühverlaufes aufzuzeigen. Bei vergilbenden Laubblättern tritt ebenso wie bei reifenden Früchten eine vorübergehende Steigerung des Gaswechsels ein, bevor die Atmungsgröße bis zum Tode des Gewebes sinkt; an den rasch verblühenden Blüten muß sich leicht nachweisen lassen, ob sie ein entsprechendes Phänomen aufweisen, wie es beispielsweise EBERHARDT vermutet hat.

* Herrn Prof. Dr. WALTER SCHUMACHER zum 60. Geburtstag gewidmet.

## Methodik

Zur manometrischen Messung des Gaswechsels (± KOH-Methode) wurden Blütenblätter oder auch (bei *Hydrocleis*) Scheiben, die mit einem Korkbohrer aus Blütenblättern ausgestanzt waren, in kegelförmige Warburg-Gefäßen von 35 bis 40 ml Inhalt gebracht, die auf dem Boden eine angefeuchtete Filtrierpapierscheibe enthielten (vgl. FISCHER 1958, 1961). Die Versuchstemperaturen lagen bei 23 und 24° C. Die Blütenblätter stammten aus dem Freiland; bis zum Beginn der Messungen muß notwendig eine gewisse Zeit zur Vorbereitung des Versuchs und zum Erreichen der Temperaturkonstanz nach Einhängen der Manometer ins Wasserbad vergehen (nicht mehr als $1^1/_2$—2 Std); während dieser Zeit konnte das Versuchsmaterial die Zimmertemperatur und die Versuchstemperatur annehmen. Wenn sich auf diese Weise auch ein physikalischer Ausgleich erreichen läßt, so sind doch die physiologischen Wirkungen, die durch den Temperaturwechsel und andere, besonders mechanische Einflüsse hervorgerufen werden, schwer zu übersehen.

Die Wirkung derartiger Faktoren auf den Gaswechsel von Blütenblättern wird demnächst RUNKEL in einer ausführlichen Arbeit behandeln; hier sollen nur einige Angaben gemacht werden, die die Bewertung der mitgeteilten Zahlen betreffen. In den meisten Versuchen fiel im Verlauf mehrerer Stunden nicht nur die Atmungsintensität sondern auch der respiratorische Quotient mehr oder weniger rasch; die Blütenblätter verschiedener Pflanzen reagieren in dieser Hinsicht in verschiedenem Maße. Im allgemeinen fallen Atmungsintensität und -quotient bei ihnen im Versuch rascher als bei Laubblättern, die bei der Verwendung der gleichen Versuchstechnik in den ersten beiden Meßstunden nur geringe Veränderungen zeigten (FISCHER 1961); ebenso verhalten sich von den bearbeiteten Blütenblättern die von *Oenothera* und in vielen Versuchen die von *Anoda*, dagegen verringern sich alle Werte bei *Hydrocleis* schnell. Schon MAQUENNE und DEMOUSSY haben sich mit dieser Erscheinung, hinter der sie einen Mangel an notwendigen Stoffen vermuteten („épuisement"), ausführlicher beschäftigt; welcher Faktor dabei zu mangeln beginnt, ist unbekannt, und es läßt sich auch nach unseren Versuchen nicht sagen, worauf die Unterschiede zwischen den einzelnen Blüten beruhen. Wenn man annehmen könnte, daß die rasche quantitative und qualitative Veränderung des Gaswechsels bei *Hydrocleis* mit dem raschen Abblühen dieser Pflanze zusammenhängen könnte, so steht dem bei der ebenso kurzlebigen Blüte von *Tradescantia virginica* eine relativ große Konstanz des Gaswechsels in mehrstündigen Versuchen gegenüber, wie hier nur erwähnt werden soll. Knospen sind oft, aber keineswegs immer, in dieser Hinsicht „empfindlicher" als geöffnete Blüten. Wie schon früher betont wurde (FISCHER 1958), ist die Wirkung der Vorbehandlung auf den Gaswechsel kaum zu eliminieren und der natürliche Ablauf der Atmung im Einzelversuch nicht unverändert zu erfassen. Vermutlich werden Atmungsintensität und -quotient im Vergleich zu den natürlichen Verhältnissen in vielen Fällen zu niedrig bestimmt, in anderen aber zu hoch, etwa wenn im aufsteigenden Ast einer Wundreaktionskurve gemessen wird; es ist fast selbstverständlich, daß mindestens in sehr vielen Fällen nicht die „richtigen" Werte gemessen werden können, wenn dieser Vorbehalt in den meisten Arbeiten auch nicht besonders betont wird. Nach meinen Versuchen und besonders denen von RUNKEL halten wir in der Bewertung von Gaswechselmessungen unter nicht kontrollierten Bedingungen, besonders bei isolierten Teilen höherer Pflanzen, große Zurückhaltung hinsichtlich der Einzelwerte für angebracht.

Mit diesem Vorbehalt, der für viele vergleichbare Untersuchungen zu machen ist, wird im folgenden versucht, an vier Versuchsobjekten den Gaswechsel der Blütenblätter von der Knospe bis zum Abblühen darzustellen. Für diese Blüten liegen uns die Ergebnisse einer größeren Anzahl von Versuchen aus verschiedenen

Entwicklungsstadien vor; es wird nicht der Einzelversuch ausgewertet, sondern die Durchschnittswerte der Messungen aus der 1. und 2. Meßstunde werden jeweils für das gleiche Entwicklungsstadium zusammengefaßt. Wenn auch die Streuung zum Teil recht groß ist, so lassen sich auf diese Weise doch entwicklungsbedingte Veränderungen im Gaswechsel in ähnlicher Weise darstellen, wie es kürzlich für Laubblätter geschehen ist. Obwohl die Werte bei *Anoda* und *Hydrocleis* aus verschiedenen Jahren stammen, zeigen sie keine für die einzelnen Jahre charakteristischen Abweichungen voneinander. Die für diese beiden Objekte schon 1958 mitgeteilten Einzelversuche sind hier mit ausgewertet worden.

## Versuchsergebnisse

In den Abb. 1 und 2 sind die Ergebnisse an zwei *Oenothera*-Arten zusammengefaßt. Die Blüten öffnen sich in den Abendstunden; sie schließen sich am folgenden Tage früher oder später, wobei die Petalen welken, bei sommerlichem Wetter ist am Abend nach dem Aufblühen die verwelkte Korolle vollständig geschlossen. Bei einigen Arten, wie bei der hier untersuchten *Oenothera berteriana*, schlägt die hellgelbe Blütenfarbe schließlich in ein schmutziges Orange um. Die Versuchspflanzen von *Oe. berteriana* wurden während des Winters im Gewächshaus vorkultiviert, so daß sie schon im Frühjahr blühreif waren; sie wurden im Mai ins Freie gebracht.

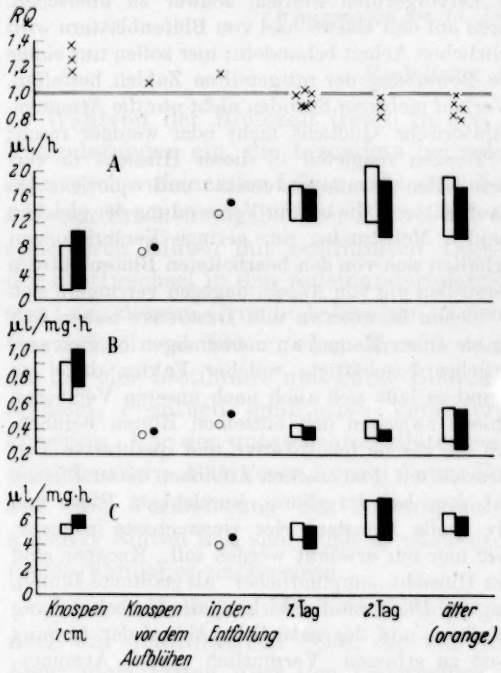



Abb. 1. *Oenothera berteriana* SPACH. Gaswechsel je Stunde im Mittel aus der 1. und 2. Meßstunde. Oben: RQ (aus B), darunter Gasumsätze in µl/h: $O_2$ ▭ ▬ $CO_2$. A Je Blütenblatt. B Je Milligramm Frischgewicht. C Je Milligramm Trockengewicht

Die in Abb. 1 dargestellten Versuche stammen aus den Monaten Mai und Juni 1958; sämtliche Meßwerte für das gleiche Entwicklungsstadium sind in einem Doppelblock zusammengefaßt, die Anzahl der Versuche geht aus dem oberen Teil des Diagramms hervor, der die RQ-Werte enthält. Die Blüten wurden für die Versuche morgens zwischen 9 und 10 Uhr gepflückt, entsprechend lag die zweistündige Meßzeit zwischen 11 und 13 Uhr. Nur die Blüten, die sich in der Entfaltung befanden, mußten naturgemäß abends gepflückt und untersucht werden.

Abb. 1 zeigt für *Oe. berteriana* eine Zunahme der Atmungsintensität je Blütenblatt während des Knospenstadiums bis zur Entfaltung; nach

Tabelle 1. *Oenothera berteriana* SPACH. *Frischgewicht und Trockengewicht je eines Blütenblattes. (Durchschnittswerte aus den in Abb. 1 dargestellten Versuchen)*

| | Frischgewicht mg | Trockengewicht mg |
|---|---|---|
| Knospe, 1 cm lang . . . . . | 10,2 | 2,1 |
| Knospe vor dem Aufblühen . | 21,1 | — |
| In der Entfaltung . . . . . | 30,2 | 3,4 |
| 1. Tag nach der Enfaltung. . | 38,2 | 3,1 |
| 2. Tag nach der Entfaltung . | 34,0 | 2,3 |
| 3. Tag nach der Entfaltung . | 30,1 | 2,3 |

dem Aufblühen läßt sich aus den streuenden Werten weder ein verminderter noch ein gesteigerter Gaswechsel klar erkennen. Im unteren Teil der Abb. 1 drückt sich vor allem der Einfluß der Wasseraufnahme der Petalen bei der Streckung aus, wodurch die Atmung, wenn sie auf das Frischgewicht bezogen wird, gerade im Streckungsstadium kleiner wird. Die durchschnittlichen Frisch- und Trockengewichte für je ein Blütenblatt sind in Tabelle 1 zusammen gefaßt; neben der Wasseraufnahme findet bis zur Entfaltung auch eine Bewegung von gelösten Substanzen in die Blütenblätter statt.

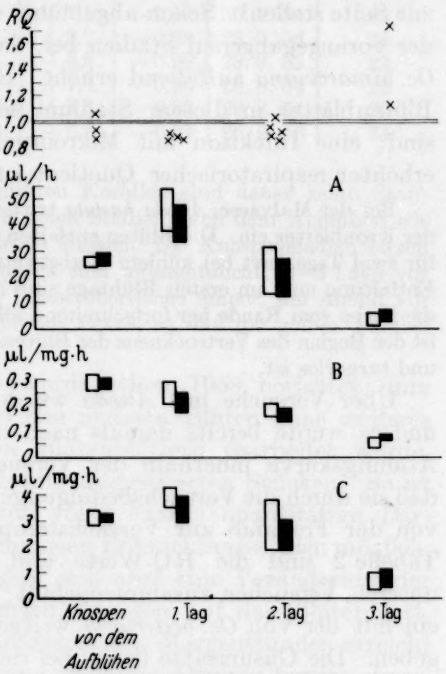



Abb. 2. *Oenothera lamarckiana* Ser. Bezeichnungen wie Abb. 1

Bei *Oe. lamarckiana* (Abb. 2) ist die Veränderung von Trokkensubstanz und Wassergehalt grundsätzlich die gleiche; die Zahlen brauchen deshalb hier nicht wiedergegeben zu werden. Vergleicht man die Abb. 1 und 2, so fällt das Nachlassen des Gaswechsels nach dem Aufblühen bei *Oe. lamarckiana* auf, das bei allen Bezugsgrößen deutlich ist. Auf das Blütenblatt bezogen steigt auch hier die Atmung während der Entfaltung, sie scheint auch auf Trockengewichtsbasis erst nach dem Aufblühen ihr Maximum zu erreichen, während bei *Oe. berteriana* die Verhältnisse weniger klar sind. Auf das Frischgewicht bezogen ist auch hier die Atmung durch die Wasseraufnahme während der Entfaltung bestimmt.

An ganzen Blüten von *Oe. biennis* fand A. MAIGE (1907, Tabelle 2) $CO_2$-Werte, die auf Blüte wie auf Frischgewicht bezogen denen aus Abb. 2 entsprechen.

Bei beiden *Oenothera*-Arten liegen die meisten RQ-Werte um 1 und darunter, es läßt sich keine Veränderung in einer bestimmten Richtung mit der Entwicklung nachweisen. Bei *Oe. berteriana* fallen die weit über 1 liegenden Werte bei den jungen Knospen auf; sie lassen sich mit denen vergleichen, die RUHLAND und ULLRICH in ihrer ersten Arbeit über die aerobe Gärung bei Pflanzen angeben: Sie maßen an jungen Knospen von *Viola tricolor hort.* respiratorische Quotienten um 1,3; den noch wesentlich höheren RQ-Werten für *Viola*-Blüten in der Entfaltung läßt sich aus unseren Versuchsergebnissen nichts entsprechendes zur Seite stellen[1]. Schon abgeblühte *Oe. berteriana* behält die RQ-Werte der vorangegangenen Stadien bei, dagegen sind sie am dritten Tag bei *Oe. lamarckiana* auffallend erhöht. Hier ist aber zu erwähnen, daß die Blütenblätter in diesem Stadium schon völlig gewelkt und turgorlos sind; eine Infektion mit Mikroorganismen und als Folge davon ein erhöhter respiratorischer Quotient ist durchaus wahrscheinlich.

Bei der Malvacee *Anoda hastata* tritt im Laufe der Anthese eine Umfärbung der Kronblätter ein. Die Blüten entfalten sich bei uns im Hoch- und Spätsommer für zwei Tage, erst bei kühlem Herbstwetter bleiben sie länger geöffnet. Bei der Entfaltung und am ersten Blühtage sind die Petalen rot gefärbt, danach schlägt die Farbe vom Rande her fortschreitend allmählich nach Blau um; die Verfärbung ist der Beginn des Vertrocknens der Blütenkrone, die am dritten Tage geschrumpft und turgorlos ist.

Über Versuche mit *Anoda* wurde schon berichtet (FISCHER 1958), und es wurde bereits damals nach dem unterschiedlichen Verlauf der Atmungskurve innerhalb der Versuchsdauer von 4—6 Std vermutet, daß sie durch die Versuchsbedingungen, insbesondere durch den Wechsel von der Freiland- zur Versuchstemperatur, bestimmt sein könne. In Tabelle 2 sind die RQ-Werte und Gasumsätze je Blütenblatt aus unseren Versuchen zusammengefaßt; die graphische Darstellung würde ein mit der von *Oe. berteriana* weitgehend übereinstimmendes Bild ergeben. Die Gasumsätze liegen bei den schon geschrumpften Blüten im Durchschnitt etwas niedriger als bei den frisch aufgeblühten; das gleiche gilt für die RQ-Werte.

Bei der tropischen Wasserpflanze *Hydrocleis nymphoides* ist die Blütezeit besonders kurz. Die Blüten öffnen sich morgens und sind bei warmem Wetter schon mittags oder am frühen Nachmittag verblüht; sie sind im hiesigen Institut schon mehrfach zu Stoffwechseluntersuchungen verwendet worden. Die Stadien des Abblühens lassen sich gut charakterisieren: Zunächst welken die Petalen vom Rande her, sie verlieren ihre schwefelgelbe Farbe und werden weiß, ein Zeichen für das Absterben von Zellen, das schließlich zum völligen Kollaps des Gewebes

[1] An jungen Knospen von *Tradescantia virginica* L. fanden wir in einem Versuch ebenfalls RQ-Werte um 2.

Tabelle 2

*Anoda hastata* Cav. *Messungen als Durchschnittswerte der 1. und 2. Meßstunde*

| | µl $O_2$/h | µl $CO_2$/h | RQ | Datum | Temperatur °C |
|---|---|---|---|---|---|
| | je Blütenblatt | | | | |
| Kleine Knospen (völlig geschlossen) | −2,9 | +2,9 | −1,00 | 16. 9. 54 | 24 |
| Kleine Knospen (Spitzen der Blüten sichtbar) | −5,2 | +5,7 | −1,09 | 14. 8. 54 | 24 |
| Größere Knospen | −8,0 | +8,0 | −1,00 | 9. 9. 54 | 24 |
| Blüten am Tage des Aufblühens (rot) | −8,7 | +8,9 | −1,02 | 25. 9. 53 | 23 |
| | −8,8 | +7,8 | −0,89 | 27. 8. 54 | 23 |
| | −8,4 | +8,3 | −0,98 | 1. 10. 56 | 24 |
| Blüten am Tage nach dem Aufblühen (blau) | −8,1 | +7,9 | −0,98 | 30. 8. 54 | 23 |
| | −8,9 | +8,2 | −0,98 | 28. 9. 56 | 24 |
| Abgeblüht und eingerollt (blau) | −6,5 | +5,8 | −0,90 | 28. 9. 53 | 23 |
| | −7,7 | +7,4 | −0,96 | 28. 8. 54 | 23 |
| | −8,0 | +7,4 | −0,93 | 29. 8. 54 | 23 |
| | −6,0 | +5,5 | −0,91 | 26. 9. 56 | 24 |

unter Infiltration führt; an den abgeblühten Korollen sind daher keine Stoffwechselmessungen mehr möglich, so daß keine Stadien nach dem Abblühen wie bei *Oenothera* und *Anoda* untersucht werden können. Die Knospenstadien lassen sich gut unterscheiden: die jungen Knospen sind untergetaucht, 2—3 Tage vor dem Aufblühen heben sie sich über die Wasseroberfläche empor, am Abend vor dem Aufblühen öffnet sich der Kelch bereits etwas, so daß die gelben Petalen sichtbar werden.

Über einen Teil der Versuche wurde schon 1958 berichtet; ihre Zusammenfassung ist nicht wie bei den anderen Blüten ohne weiteres möglich, weil teilweise mit ganzen Blütenblättern gearbeitet wurde, bei den späteren Stadien aber auch mit ausgestanzten Stücken. So ist aus unserem Versuchsmaterial keine völlig exakte quantitative Darstellung des Gasumsatzes auf verschiedenen Entwicklungsstufen möglich. Aus einer Überschlagsrechnung ergibt sich aber eine Veränderung der Atmungsgröße, bei der das Maximum, bezogen auf das Blütenblatt, schon vor dem Öffnen der Knospe in den frühen Morgenstunden erreicht ist; während und nach der Entfaltung sinkt die Atmung bereits etwas. Wegen des Gewebezerfalls, der bei *Hydrocleis* die Untersuchung der späteren Stadien verbietet, ist kein vollständiger Vergleich mit den Blüten von *Oenothera* und *Anoda* möglich; soweit *Hydrocleis* untersucht werden konnte, fehlt aber jedenfalls eine Atmungssteigerung beim Verblühen.

*Hydrocleis* ist durch eine ausgeprägte Abnahme des respiratorischen Quotienten beim Abblühen interessant (Fischer 1958). In Tabelle 3 sind die RQ-Werte für die untersuchten Stadien zusammengestellt, und zwar wegen des erwähnten raschen Absinkens der Werte getrennt

für die erste und für die zweite Versuchsstunde. Die RQ-Abnahme, die schon vor dem Aufblühen erkennbar ist, unterscheidet diese Blüte von anderen (vgl. FISCHER 1960; die dort in Tabelle 3, S. 524 angegebenen RQ-Werte stammen nur aus den Versuchen der Arbeit von 1958, daher weichen die Zahlen von den hier wiedergegebenen umfassenderen etwas ab).

Tabelle 3

*Hydrocleis nymphoides* BUCHENAU. *RQ-Werte. Versuchstemperatur 23 und 24° C*

| | 1. Stunde | | | 2. Stunde | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Knospen, noch submers . . . . . | | 1,12 | | | 0,98 | |
| Größere Knospen, emers . . . . . | | 1,21 | | | 0,87 | |
| Knospen am Abend vor dem Aufblühen . . . . . | 1,06 | 1,04 | 1,02 | 0,99 | 1,01 | 0,95 |
| Knospen kurz vor dem Öffnen morgens . . . . . | 0,91 | 0,86 | 0,78 | 0,82 | 0,82 | 0,71 |
| Blüten in der Entfaltung . . . . | 0,89 | 0,78 | 0,89 | 0,94 | 0,78 | 0,85 |
| Blüten entfaltet . . . . . | 0,78 \| 0,79 | | | 0,73 \| 0,78 | | |

Die Tabelle zeigt die rasche Verminderung des RQ-Wertes im Versuch; man darf wohl annehmen, daß auch in der ersten Versuchsstunde die Werte gegenüber den natürlichen Verhältnissen zu niedrig gemessen wurden. Die Veränderung der RQ-Werte mit dem Alter der Blüte schon vor dem Aufblühen wird aber deutlich. In den Knospen war die während des Versuchs auftretende RQ-Verminderung meist ausgeprägter als in den entfalteten Blüten; dies spricht dafür, daß die wirkliche RQ-Differenz zwischen Knospen und älteren Stadien eher größer ist, als sie gemessen werden konnte. Sie ist also sicherlich als real anzusehen, wenn auch die absolute Höhe der Werte von den natürlichen Verhältnisse abweichen dürfte.

## Diskussion

### *Atmungsintensität*

Beim Vergleich der Atmungsintensität in verschiedenen Blühstadien und mit dem Gaswechsel anderer Organe tritt die Frage der Bezugsgröße in den Vordergrund. Die vorstehenden Versuche haben ergeben:

Auf Organbasis bezogen erreicht die Atmung von den jungen zu den älteren Knospen ansteigend ihr Maximum etwa im Stadium der Entfaltung *(Oenothera, Anoda)* oder etwas vorher *(Hydrocleis)*; in den entfalteten Blütenblättern sinkt sie entweder sehr deutlich *(Oe. lamarkkiana)* oder nur wenig ab *(Oe. berteriana, Anoda, Hydrocleis)*. Bezieht man auf das Frischgewicht, so nimmt infolge der starken Wasseraufnahme bei der Entfaltung und Streckung die Atmung schon in den Entwicklungsstadien ab, in denen sie je Blütenblatt gerade steigt. Legt

man das Trockengewicht zugrunde, so kann der Atmungsverlauf dem je Blütenblatt mehr oder weniger entsprechen, wie der Vergleich der Abb. 1 und 2 zeigt; neben der absoluten Atmungsgröße entscheidet die Veränderung der Trockensubstanz, also Atmungsverluste, Zu- und Ableitung. Die Stoffbewegungen zu und aus den Blütenblättern sind bei den Blüten der verschiedenen Pflanzen durchaus nicht gleich, während der Wassergehalt wohl allgemein mit der Entfaltung sein Maximum erreicht (Literatur bei FISCHER 1960).

Soweit sich in der Literatur Angaben über den Gaswechsel im Laufe der Blütenentwicklung finden, stimmen sie mit unseren Ergebnissen überein. Nachdem schon A. MAIGE (1907) die Bedeutung der Bezugsgröße für die Kenntnis der Blütenatmung betont und gezeigt hatte, daß bei ganzen Blüten zahlreicher Pflanzen die $CO_2$-Abgabe je Blüte von der Knospe bis zur voll entfalteten Blüte steigt, stellte G. MAIGE (1911, Tabelle 5) in Versuchen an der Korolle (ganze Krone oder Petalen) den Unterschied zwischen der Atmungsgröße auf Organ- bzw. Frischgewichtsbasis klar heraus. Obwohl die Angaben über die Entwicklungsstadien nicht genau sind, läßt sich doch auch aus G. MAIGEs Zahlen deutlich erkennen, daß bei verschiedenen Pflanzen die Atmung der jungen Petalen absolut zunächst ansteigt, während sie wegen der Wasseraufnahme gleichzeitig auf Frischgewichtsbasis schon abnimmt. Bei den Sepalen liegen die Verhältnisse ähnlich.

Einige neuere Untersuchungen bestätigen die älteren Arbeiten. So atmen nach ULRICH und PAULIN ganze *Iris*-Blüten, wenn auf die Blüte bezogen wird, während ihrer Entfaltung am stärksten. Dies bestätigt auch AARTS, der im Hinblick auf die Haltbarkeit von Blumen mit einer größeren Anzahl von Zierpflanzen experimentierte; die $O_2$-Aufnahme (manometrisch meist an ganzen Blüten gemessen) verändert sich während der Entwicklung der Blüten auf Frischgewichts- und Organbasis wie geschildert, je Trockengewicht sind die Kurven nicht bei allen Blüten gleich. Bei ganzen *Rosa*- und *Gardenia*-Blüten (SIEGELMAN) sinkt die $CO_2$-Aufnahme je Frischgewicht im Laufe des Blühens (ohne Knospenstadium, „at normal commercial maturity") um so schneller, je höher die Temperatur ist, bei der das Material gehalten wird.

Für die Erörterung, ob die Blütenatmung spezifische Züge trägt, ist der Vergleich mit Laubblättern angebracht. Fortlaufende Atmungsmessungen für Knospen- und Blattstadien sind anscheinend nur sehr lückenhaft publiziert worden. Höhere Atmung der Knospen gegenüber späteren Stadien läßt sich schon aus GARREAUs Zahlen herauslesen; nach BORODIN steigt bei jungen *Tilia*knospen die Atmung je Knospe vom zeitigen Frühjahr bis zum Austreiben. Je nach der Geschwindigkeit der Wasseraufnahme wird die Atmung je Frischgewicht früher oder später ihr Maximum erreichen, nach welchem sie meist wieder

geringer wird. Das Maximum je Blatt bzw. je Zelle wird nicht überall im gleichen Stadium der Blattentwicklung erreicht (BEZAGU), bei Erdbeerblättern liegt es nach ARNEY vor dem Abschluß der Entfaltung. Weitere Hinweise geben MAQUENNE und DEMOUSSY sowie NICOLAS; über die Atmung in Abhängigkeit vom Blattalter in den voll entwickelten Blättern gibt es umfassendere Angaben (Zusammenfassungen bei JAMES, PAECH und EBERHARDT sowie PRICE). Wenn auch das Bild der Atmungsintensität in den jungen Stadien bis zur Entfaltung nur in groben Umrissen gezeichnet werden kann, so scheint es doch, daß diese bei Blüten- und Laubblättern im wesentlichen gleich sind.

*Gibt es ein Atmungsklimakterium bei Blütenblättern?*

Die weitere Lebensgeschichte der Laubblätter ist durch ihre wesentlich längere Lebensdauer gekennzeichnet, der bei Blütenblättern in manchen Fällen ein Verblühen innerhalb weniger Stunden gegenübersteht. Bei Laubblättern sinkt die Atmungsgröße des Einzelblattes im Laufe seines Lebens mehr oder weniger deutlich; bei Blättern, die vor dem Absterben vergilben, tritt ungefähr mit der sichtbaren Verfärbung eine Atmungssteigerung ein, der ein rasches Absinken bis zum Tode des Blattes folgt (FISCHER 1961).

Die hier mitgeteilten Versuche geben keinen Hinweis auf vergleichbare Vorgänge bei Blüten. Bei *Oe. lamarckiana* ist die sinkende Atmung für alle drei Bezugssysteme überzeugend; auch bei den drei anderen Objekten tritt kein Wiederansteigen auf (die etwas höher liegenden Werte im untersten Teil der Fig. 1 am 2. Tag beruhen auf einer Verminderung des Trockengewichts in diesem Stadium). Wie schon erwähnt, haben auch andere Autoren keine Atmungssteigerung gefunden, obwohl SIEGELMANs Versuche gerade dieser Frage gewidmet sind; allerdings wendet der Autor selbst ein, daß sein Ergebnis nicht ganz eindeutig sei, weil er mit ganzen Blüten arbeitete, und daher Petalen ungleichen Alters verwendete, wodurch ein kurzdauernder Atmungsanstieg verborgen geblieben sein könnte.

Seit der Fertigstellung des Manuskriptes für meinen Beitrag zum Handbuch der Pflanzenphysiologie (FISCHER 1960), in der die Frage eines Atmungsklimakteriums bei Blüten kurz gestreift wurde, sind zwei neue Arbeiten hierzu erschienen. Gemeinsam mit CHOW und BIALE hat SIEGELMAN weitere Untersuchungen über die Atmung von Rosenpetalen mitgeteilt, und GRIESEL und BIALE haben ihre interessanten Ergebnisse an Magnolienblüten ausführlich publiziert. In beiden Arbeiten wurde der $O_2$-Verbrauch von Stücken aus Blütenblättern manometrisch in Phosphatpuffer bestimmt.

Die erste Arbeit verfolgt neben Versuchen zur Charakterisierung der Blütenatmung und der dabei beteiligten Enzymsysteme die Größe des

$O_2$-Verbrauchs in verschiedenen Stadien von der beginnenden Entfaltung bis zur voll aufgeblühten Rose, wobei nur die fünf äußersten Petalen untersucht wurden. Die Atmung erreicht ihr Maximum für alle verwendeten Bezugsgrößen (Trockengewicht, Gesamt-N, unlösl. P und je Zelle), wenn die Blüten voll geöffnet sind. Ein zweiter Anstieg in einem späteren Stadium fehlt auch hier; die Autoren betonen, daß das von ihnen gefundene (und allgemein verbreitete) Maximum morphologisch dem Atmungsklimakterium nicht zu vergleichen sei. Nach Griesel und Biale bleibt bei ausgestanzten Stücken aus Blütenblättern von *Magnolia grandiflora* die $O_2$-Aufnahme in den letzten 8 Tagen vor dem Öffnen der Knospen fast gleich, erst mit der Entfaltung findet eine Steigerung statt (Bezugsgröße ist hier das Trockengewicht); in diesem Stadium setzen zugleich überraschende und sehr erhebliche Tagesschwankungen des $O_2$-Verbrauchs mit den höchsten Werten in den frühen Morgenstunden ein, die innerhalb der Blühdauer von 4—5 Tagen wieder abklingen. Auf diesen Atmungsrhythmus soll hier nicht eingegangen werden, da er in der Arbeit von Runkel im Zusammenhang mit eigenen Messungen diskutiert werden wird. Das Maximum der Atmungsgröße liegt (gleich ob man die Morgen- oder die Abendwerte zugrunde legt) am zweiten Tage; die Autoren heben selbst die zeitliche Übereinstimmung des Atmungsanstiegs mit dem Öffnen der Knospen hervor, die erst zur Zeit der höchsten Atmung am zweiten Tage voll entfaltet sind. Weil die Atmung auch hier wie bei der Entfaltung von Laubblättern in der Phase der Streckung gesteigert wird, möchten wir dieses Maximum nicht als „klimakterisch" ansehen, obwohl schon am darauffolgenden Tage mit dem beginnenden Braunwerden der Blütenblätter die ersten Zeichen des Verblühens sichtbar werden; am dritten Tage sinkt aber auch die Atmungsgröße bereits wieder, und ihre Tagesschwankungen lassen nach.

Zwei weitere Beispiele sind in diesem Zusammenhang noch zu erwähnen. Bei dem besonders intensiv atmenden Appendixgewebe von *Arum maculatum* wird nach James und Beevers das Maximum der $O_2$-Aufnahme (bezogen auf die gleiche Zahl von Gewebeschnitten) mit dem Maximum des Trockensubstanzgehalts erreicht; wegen der starken Kohlenhydratverbrennung fällt danach das Trockengewicht stärker als die Atmung, so daß eine Atmungssteigerung im älteren Appendix nur resultiert, wenn man auf das Trockengewicht bezieht, während der Gaswechsel des gesamten Organs bereits stetig geringer wird. — In meinen Versuchen an *Ipomoea leari* und *I. tricolor* (Fischer 1958, Abb. 2A und B) findet sich bei Versuchen, die am Vormittag, also bald nach dem Aufblühen der ephemeren Blüten, begonnen wurden, eine Steigerung des Gaswechsels bis zum Mittag und Nachmittag, die vielleicht hierher gehören könnte. Wie im methodischen Teil schon betont

wurde, läßt sich hier aber nicht ausschließen, daß der Kurvenverlauf bei den 7 und 4 Std dauernden Versuchen durch die Versuchsanstellung selbst (Temperaturwechsel, Verwundung usw.) bestimmt sein könnte, also möglicherweise nicht den natürlichen Ablauf darstellt. Auch hier ist also die erneute Atmungssteigerung unbewiesen. (Da die Knospen bei *Ipomoea* wegen technischer Schwierigkeiten nicht untersucht wurden, ist keine Zusammenfassung in der Art wie bei *Anoda* und *Oenothera* möglich.)

Wenn sich demnach aus unseren Versuchen und aus der Literatur ein späteres Atmungsmaximum in den bereits entfalteten Blütenblättern nicht feststellen läßt, so möchten wir den allgemein festgestellten Höhepunkt der Atmung nicht als „klimakterisch" bezeichnen, sondern ihn entsprechend den Verhältnissen bei Laub- und Blütenblättern gerade als „jugendlich" ansehen. Daher scheint uns auch der Begriff „Reifungsanstieg" (WOLF 1960, S. CCXIV) zur Bezeichnung dieser Erscheinung gemeinsam mit den Atmungssteigerungen bei reifenden Früchten und vergilbenden Blättern nicht angebracht, auch abgesehen davon, daß die letztgenannten Atmungsgipfel verschiedener Natur sein dürften (FISCHER 1961). Für ein physiologisches Verständnis soll dabei nicht übersehen werden, daß Blüten- und Laubblätter nach der Entfaltung hinsichtlich der Plastiden und ihres Stoffwechsels sich nicht im gleichen Zustand befinden: Bei vielen Blüten ist der Übergang vom Chloroplasten zum Chromoplasten schon vor dem Aufbrechen der Knospen vollzogen, während bei den Laubblättern die entsprechende Änderung erst lange nach der Entfaltung eintritt (SEYBOLD 1943). Wenn „Klimakterium" und Vergilben überall zusammenhingen, müßten sie bei solchen Blüten schon in die Zeit vor dem Aufblühen fallen.

Es muß schließlich darauf hingewiesen werden, daß auch in den letzten Lebensstadien von Blütenblättern vorübergehende Steigerungen des Gaswechsels vorkommen können. AARTS fand bei der Untersuchung ganzer Blüten von *Dianthus plumarius*, die tagelang in Vasen standen, eine erhöhte $O_2$-Aufnahme, die mit dem Zusammenfalten und Turgorverlust der Kronblätter zusammenfällt; danach folgt ein rasches Sinken der Atmung, der Kurvenverlauf ist also durchaus „klimakterisch". Die Realität der Erscheinung, die auch an isolierten Petalen zu beobachten ist, ist nicht zu bezweifeln, da in Versuchen, in denen durch Saccharosezusatz zum Vasenwasser die Lebensdauer der Blüten verlängert wurde, der Atmungsanstieg entsprechend später auftrat. An Zungenblüten von Dahlien fand RUNKEL gelegentlich in einem Stadium, in dem die Blütenfarbe schon von Gelb nach Braun umschlug, eine Atmungssteigerung, die ebenfalls später auftrat, wenn die Blüten durch niedrigere Temperaturen länger am Leben gehalten wurden. Diese Beobachtung, über die im größeren Zusammenhang berichtet werden wird, ist aber ebenso wie

die von AARTS an *Dianthus* in einem prämortalen Stadium gemacht worden, das mit den fraglichen Zuständen bei vergilbenden Blättern und reifenden Früchten kaum verglichen werden kann. In unseren Versuchen fehlt übrigens bei *Oenothera* und *Anoda*, die ebenfalls wie *Dianthus plumarius* unter Verwelken abblühen, eine solche späte Atmungssteigerung. Wir möchten sie daher (wie auch AARTS) nicht mit den genannten Phänomenen vergleichen, die offenbar Teile der normalen Entwicklung sind, sondern eher mit Atmungssteigerungen, wie sie auch für pathologischen Wasserverlust von Blättern bekannt sind.

*Atmungsquotient*

Hinsichtlich der RQ-Veränderungen lassen sich die Verhältnisse bei Blüten- und Laubblättern für die Jugendstadien ebenfalls parallelisieren: Bei den Knospen liegen die Werte vielfach über 1, bei den ausgewachsenen Blättern um 1 und darunter (FISCHER 1960, 1961). Auch die *Oenothera*-Versuche bringen hierzu nichts Neues (über die hohen RQ-Werte bei der bereits abgeblühten *Oe. lamarckiana* vgl. S. 434). Die Erhöhung des Gaswechsels bei den vergilbenden Laubblättern nach der „Reife" wird von einer mehr oder weniger deutlichen vorübergehenden RQ-Senkung begleitet, der eine RQ-Erhöhung folgt, die über die Einheit hinausgehen kann; diese RQ-Änderungen fehlen bei Blütenblättern ebenso wie der Atmungsanstieg selbst. Im Hinblick auf mögliche Beziehungen zwischen Eiweißabbau und RQ-Senkung bei vergilbenden Blättern soll hier noch einmal darauf hingewiesen werden, daß allein bei *Hydrocleis* eine ausgeprägte RQ-Verminderung beim Abblühen gefunden wurde, also bei einer Blüte, in deren Petalen nach SCHUMACHER in dieser Phase der Eiweißabbau besonders intensiv ist. Ob dabei auch eine Oxydation der Eiweißspaltprodukte stattfindet, ehe die Zellstruktur völlig zusammenbricht, ist nicht bekannt; wenn eine solche von einer Atmungssteigerung begleitet wäre, könnte diese dadurch verborgen bleiben, daß beim Abblühen die Zahl der atmenden Zellen durch Absterben geringer wird. Gerade der rasche Verfall des Gewebes mahnt aber zur Vorsicht bei der Deutung der vorliegenden Tatsachen. Über den Eiweißhaushalt der Blüten von *Oenothera*, *Anoda* und *Ipomoea* ist nichts bekannt. Da es sich hier um Blüten handelt, die beim Abblühen nicht turgeszent abfallen sondern verwelken, ist nach SCHUMACHER auch bei ihnen ein Eiweißabbau nicht unwahrscheinlich; er wäre aber in diesen Blüten nicht mit einer Atmungssteigerung und RQ-Senkung verbunden. Vielleicht kann man darin einen Hinweis sehen, daß die bisher nur vermutete Beziehung zwischen Eiweißhaushalt und Gaswechsel beim natürlichen Vergilben von Laubblättern bevorzugt das Eiweiß der Chloroplasten betrifft, also eine Komponente, die den Blütenblättern fehlt.

## Zusammenfassung

Durch Zusammenstellung der Ergebnisse von Messungen an kurzlebigen Blütenblättern wurde für vier Pflanzen ein Überblick über den Gaswechsel vom Knospenstadium bis zum Verblühen gewonnen.

Auf das Blütenblatt bezogen steigt die Atmung allgemein bis zur Entfaltung, während sie auf Frischgewichtsbasis schon während der Wasseraufnahme vor dem Aufblühen abnimmt.

Die respiratorischen Quotienten, die bei den Knospen oft über der Einheit liegen, fallen mit dem Aufblühen auf 1 und darunter. Eine ausgeprägte RQ-Senkung während des Abblühens findet sich nur bei *Hydrocleis nymphoides*.

Die Ergebnisse werden insbesondere im Hinblick auf die Frage einer etwa vorhandenen „klimakterischen" Atmungssteigerung bei Blütenblättern erörtert. Für eine solche ergeben sich keine Anhaltspunkte; der Höhepunkt des Gaswechsels ist demjenigen bei der Entfaltung von Laubblättern vergleichbar.


Für ihre verständnisvolle Mitarbeit danke ich Frau ROSEMARIE SCHNEPF, geb. LANGBEIN.

## Literatur


AARTS, J. F. T.: Over de houdbaarheid van snijbloemen. (On the keepability of cut flowers.) Meded. Landbouwhoogeschool Wageningen **57**, 1—62 (1957).

ARNEY, S. E.: The respiration of strawberry leaves attached to the plant. New Phytologist **46**, 68—96 (1947).

BEZAGU, M.: Variations de la respiration des cellules de la feuille avec l'âge. C. R. Acad. Sci. (Paris) **169**, 701—702 (1919).

BORODIN, J.: Über die Atmung austreibender Knospen an abgeschnittenen Zweigen. Arb. Petersburger Naturforsch.-Ges. **23** (1893). Zit. nach Bot. Zbl. **58**, 374—375 (1894).

EBERHARDT, F.: Der Atmungsverlauf alternder Blätter und reifender Früchte. Planta (Berl.) **45**, 57—65 (1955).

FISCHER, H.: Gaswechselmessungen an Blütenblättern. Z. Bot. **46**, 85—97 (1958).

— Atmung von Blüten und Blütenständen. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 12/2, S. 521—535. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.

— Über den Gaswechsel vergilbender Laubblätter. Flora (Jena) **150**, 416—426 (1961).

GARREAU: Nouvelles recherches sur la respiration des plantes. Ann. Sci. nat., III. sér., Bot. **16**, 271—292 (1851).

GRIESEL, W. O., and J. B. BIALE: Respiratory trends in perianth segments of *Magnolia grandiflora*. Amer. J. Bot. **45**, 660—663 (1958).

JAMES, W. O.: Plant respiration. Oxford 1953.

—, and H. BEEVERS: The respiration of *Arum* spadix. A rapid respiration resistant to cyanide. New Phytologist **49**, 353—374 (1950).

MAIGE, A.: Recherches sur la respiration de la fleur. Rev. gén. Bot. **19**, 8—28 (1907).

MAIGE, G.: Recherches sur la respiration des differentes pièces florales. Ann. Sci. nat., IX. sér., Bot. **14**, 1—62 (1911).

Maquenne, L., et E. Demoussy: Nouvelles recherches sur les échanges gazeux des plantes vertes avec l'atmosphère. Paris 1913.

Nicolas, G.: Contribution à l'étude des variations de la respiration des végétaux avec l'âge. Rev. gén. Bot. **30**, 209—225 (1918).

Paech, K., u. F. Eberhardt: Altern und Zelltod. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 2, S. 908—936. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1956.

Price, C. A.: Respiration and development of vegetative plant organs and tissues. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 12/2, S. 493—520. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.

Ruhland, W., u. H. Ullrich: Aerobe Gärung in wachsenden Pflanzengeweben. Ber. sächs. Akad. Wiss. Leipzig, math.-phys. Kl. **88**, 11—20 (1936).

Runkel, K. H.: Diss. Bonn (in Vorbereitung).

Schumacher, W.: Über Eiweißumsetzungen in Blütenblättern. Jb. wiss. Bot. **75**, 581—608 (1931).

Seybold, A.: Zur Kenntnis der herbstlichen Laubblattfärbung. Bot. Arch. **44**, 551—568 (1943).

Siegelman, H. W.: The respiration of Rose and Gardenia flowers. Proc. Amer. Soc. horticult. Sci. **59**, 496—500 (1952).

— C. T. Chow and J. B. Biale: Respiration of developing rose petals. Plant Physiol. **33**, 403—409 (1958).

Ulrich, R., et A. Paulin: Observations sur les inflorescences isolées d'*Iris*. Rev. gén. Bot. **64**, 93—105 (1957).

Wolf, J.: Einleitung und Übersicht. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 12/1, S. LXIII—CCLXXX. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.

Prof. Dr. Hermann Fischer, Botanisches Institut der Universität Bonn, Meckenheimer Allee 170

Planta 57, 444—454 (1961)

Aus dem Botanischen Institut der Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau der Technischen Hochschule München

# MODELLVERSUCHE ZUR KLÄRUNG EINIGER PROBLEME DER ABGABE VON AMINOVERBINDUNGEN DURCH DIE WURZELN HÖHERER PFLANZEN IM BODEN*

Von

BURKHARD FRENZEL

Mit 1 Textabbildung

*(Eingegangen am 12. Juli 1961)*

## A. Einleitung

Die in den letzten Jahren von mehreren Seiten durchgeführten Untersuchungen zur Abgabe organischer Substanzen durch die Wurzeln höherer Pflanzen haben zum Teil voneinander erheblich abweichende Ergebnisse geliefert (Literatur bei BÖRNER 1960; FRENZEL 1960; RADEMACHER 1959). Zwar wurde wiederholt deutlich, daß den Wurzeln höherer Pflanzen sowohl bei Anwendung steriler Wasser- als auch steriler Sandkultur lebenswichtige organische Substanzen sehr verschiedener Stoffklassen zu entweichen vermögen. Ob sich dahinter aber ein aktiver Stoffwechselvorgang lebender Zellen oder vielmehr ein passiver Austritt der betreffenden Substanzen aus geschädigten, absterbenden oder toten Zellen verbirgt, konnte nicht allgemeingültig entschieden werden. Außerdem gab die Tatsache, daß die im Wurzelraum scheinbar nachweisbare Substanzmenge bei Anwendung steriler Sandkultur meist wesentlich geringer ist als bei steriler Wasserkultur zu berechtigten Zweifeln Anlaß, ob die bei steriler Wasserkultur der Versuchspflanzen erzielten Resultate tatsächlich auf die natürlichen Verhältnisse übertragen werden dürfen, zumal da im Freiland nur in den seltensten Fällen echte allelopathische Erscheinungen zweifelsfrei erkannt werden konnten, die zudem meist auf Ausscheidungen durch Drüsen des Sprosses, nicht aber auf Abgaben aus den Wurzeln zurückzuführen sind. Andererseits lassen die Erscheinungen der Wirtssuche bestimmter Schmarotzerarten, der Rhizosphäre, der Mykorrhiza, der Knöllchenbakterien u.ä. auf Stoffabgaben aus den Wurzeln höherer Pflanzen schließen, die uns heute noch vielfach unklar sind.

Die erwähnten Unstimmigkeiten in unserer bisherigen Kenntnis von der Abgabe organischer Substanzen durch die Wurzeln höherer Pflanzen machten es wünschenswert, bestimmte Einzelheiten dieses Problemkreises bei Vertretern verschiedener Pflanzenarten mit einheitlicher

* Herrn Prof. Dr. WALTER SCHUMACHER zum 60. Geburtstag gewidmet.

Methodik zu bearbeiten, denn es scheint, daß manche Unklarheit durch die Anwendung unterschiedlicher Untersuchungsverfahren und verschiedener Versuchsobjekte entstanden ist.

Nachdem festgestellt worden war, daß wenige Tage alte Sonnenblumenwurzeln bei Sterilkultur auf Knopscher Nährlösung elf verschiedene Aminosäuren und Amide an das Nährmedium abgeben, und daß dieser Vorgang vom Stoffwechsel lebender Zellen gesteuert wird (FRENZEL 1960), wurde zunächst untersucht, ob dasselbe auch für Vertreter einer anderen Pflanzenart zutrifft. Als Versuchsobjekt diente *Pisum sativum* („Kleine Rheinländerin"). Außerdem sollte geklärt werden, in welchem Maße die mit sterilen Wasserkulturen gewonnenen Erfahrungen auf die in mineralischen Böden waltenden Verhältnisse übertragen werden dürfen.

## B. Methodik

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Abgabe von Asparagin, Valin, Leucin und Threonin durch die Wurzeln von *Helianthus annuus* sowie *Pisum sativum* mit Hilfe der bereits früher verwandten Defektmutanten von *Neurospora crassa* getestet (vgl. FRENZEL 1960, dort auch Angaben über Kultur und Kontrolle der Pilzstämme). Dieses Verfahren wurde gewählt, weil es einerseits sehr spezifisch auf die abgegebenen Substanzen reagiert, und da andererseits die Lokalisation des sich bildenden Pilzmycels Rückschlüsse auf den Ort, damit aber auch auf den Lebenszustand der die Substanzen abgebenden Zellen, bereits makroskopisch zu ziehen gestattet.

Da die Physiologie der Abgabe der geprüften Aminoverbindungen an die sterile Knopsche Nährlösung durch steril kultivierte, intakte Sonnenblumenwurzeln schon bekannt war (FRENZEL 1957, 1960), wurde zunächst die Abgabe dieser Substanzen durch Wurzeln steril kultivierter Erbsenpflanzen geprüft. Hierzu wurden die Samen gebeizt (5 min etwa 70%iger Alkohol, 25 min 1%ige wäßrige Bromlösung, mehrmaliges Waschen in sterilem Wasser: Im Mittel wurden etwa 15% der Samen durch die Beizung abgetötet. Die überlebenden Samen waren meist ausnahmslos steril und entwickelten kräftige Keimpflanzen) und anschließend, wie bereits für die Sonnenblumen beschrieben worden ist (FRENZEL 1957), 4—5 Tage lang in Reagensgläsern auf Filtrierpapierstreifen, die mit Knopscher Nährlösung getränkt waren, im Dunkeln steril kultiviert, bis sich 2—3 cm lange Wurzeln gebildet hatten. Hierauf wurden die Keimpflanzen in der Impfkammer in die ebenfalls früher beschriebenen Kulturgefäße umgepflanzt, deren Nährlösung vorher mit den entsprechenden Pilzstämmen beimpft worden war (Verfahren vgl. FRENZEL 1960), und 9—10 Tage lang belichtet (16 Std-Tag, 2 Leuchtstoffröhren Osram HNW 202 T, 4000 Lux im Bereich der Blätter) und belüftet kultiviert. Bei Versuchsende hatte sich meist das 5. oder 6. Folgeblatt entwickelt. Nach Ablauf dieser Frist wurde noch in den Kulturgefäßen das Mycelwachstum der betreffenden Pilzstämme auf den Wurzeln der „Wirtspflanze" makroskopisch und mit Hilfe der Lupe genau untersucht.

Um die Frage beantworten zu können, ob die Wurzeln der Versuchspflanzen bei Sterilkultur auf mineralischem Boden in ähnlicher Weise die zu prüfenden Substanzen abgeben wie bei Anwendung steriler Wasserkultur, wurden die steril kultivierten Pflanzen, nachdem sie etwa 5—6 cm lange Wurzeln entwickelt hatten,

in der Impfkammer einzeln in sterile (im Abstand von 24 Std zweimalige Sterilisation im Dampftopf) Glasrohre gepflanzt (Abb. 1[1]; Länge der Rohre 300 mm, lichte Weite 14 mm), die als „Modellboden" mit Glasperlen (3 mm ⌀) gefüllt waren. Der „Boden" war mit steriler Knopscher Nährlösung übersättigt (Abb. 1). Jeweils 8—10 Glasrohre mit dem erwähnten „Modellboden" (im folgenden als „Perlenkultur" bezeichnet) standen derselben Zahl an Kontrollen gegenüber, in denen die Rohre nur mit Knopscher Nährlösung, nicht aber mit Perlen gefüllt waren (weiterhin als „Wasserkultur" bezeichnet). Die Versuchspflanzen wurden mit einem trocken-sterilisierten Wattering direkt unterhalb der Kotyledonen (Erbse) bzw. am Wurzelhals (Sonnenblume) in den Rohren befestigt (der Sproß war also von diesem Zeitpunkt an unsteril) und im 16 Std-Tag ohne Belüftung des Wurzelraumes kultiviert, bis nach etwa 5 Tagen das 3. Folgeblatt (-paar) entwickelt war. Die Wurzeln wurden während der Versuche verdunkelt.

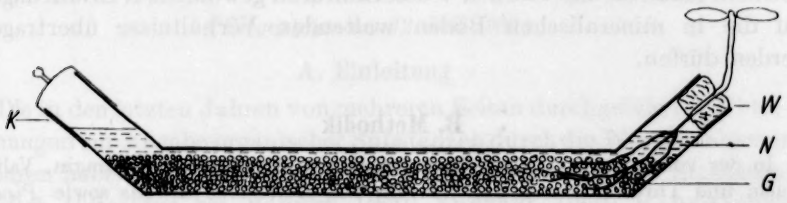



Abb. 1. Schematische Skizze eines mit dem Modellboden beschickten Kulturgefäßes. *G* Glasperlen-„Boden"; *K* Kapsenberg-Kappe; *N* Nährlösung; *W* Wattestopfen

In der ersten Versuchsreihe sollten Erfahrungen über den Ort der Substanzabgabe aus den Wurzeln der Versuchspflanzen gesammelt werden. Hierzu wurden die Rohre nach beendeter Sterilisierung jeweils mit etwa 2 ml Sporensuspension (Herstellung der Suspension vgl. FRENZEL 1960) beimpft, und erst danach wurden die höheren Pflanzen eingepflanzt. Fortlaufend durchgeführte Lupenbeobachtungen über die Ausbildung des Mycels in der Perlen- und Wasserkultur ergaben Aufschluß über den Ort der Substanzabgabe.

Die zweite Versuchsreihe hatte zum Ziel, quantitative Angaben über die tatsächlich abgegebene Substanzmenge (in der Nährlösung gelöste Stoffe einschließlich der adsorptiv an den Perlen gebundenen) zu erhalten. Hierzu wurden die Pflanzen zunächst steril ohne Beimpfung mit *Neurospora crassa*-Defektmutanten, wie bereits beschrieben, kultiviert. Nach vorsichtiger Entfernung der Wurzeln aus den Rohren wurden bei Versuchsende die von den Wurzeln an das Substrat abgegebenen Substanzen mit 70%igem Alkohol 12 Std lang kalt extrahiert. Nach 5—6tägiger Kultur waren in je acht Wasserkulturrohren im Mittel noch 150 ml Nährlösung vorhanden (anfangs 240 ml). Dieses Volumen diente als Ausgangspunkt zur Berechnung der erforderlichen Alkoholmenge. Auf dieselben Werte wurde durch Zusatz frischer Knopscher Nährlösung die aus den Perlenkulturrohren gewonnene Nährlösungsmenge (aus acht Rohren etwa 50 ml; anfangs 140 ml) aufgefüllt und mit der entsprechenden Alkoholmenge extrahiert, um in den Extrakten der Wasser- und der Perlenkultur ungefähr gleiche Nährsalzmengen zu erhalten. Anschließend wurden der Alkohol abdestilliert und die Nährlösung auf dem Wasserbad eingedampft. Der Rückstand der Wasser- bzw. der Perlenkultur-Nährlösungen wurde mit jeweils 40 ml einer Lösung aufgenommen, in der

[1] Diese Rohre standen von früheren Versuchen mit *Neurospora* bereits zur Verfügung (RYAN, BEADLE und TATUM 1943); ihre Form war also nicht erst für die vorliegenden Experimente entworfen worden.

15 g Saccharose, 5 g Ammoniumtartrat und $5 \times 10^{-6}$ g Biotin pro 1000 ml Aqua bidest. (Quarz) enthalten waren. Nach 20minütiger Sterilisation im Autoklaven (1,5 atm) wurden diese beiden, in 100 ml-Erlenmeyerkolben gefüllten Nährlösungstypen jeweils mit einer Platinschlinge voll Sporensuspension der Valine-less-Defektmutante beimpft und 1 Woche lang bei 22—25° bebrütet. Anschließend wurde das Trockengewicht des entstandenen, dicht verfilzten Pilzmycels auf der Analysenwaage bestimmt.

## C. Versuchsergebnisse

### *1. Der Ort der Substanzabgabe an Erbsen- und Sonnenblumenwurzeln*

Bei früheren Versuchen (FRENZEL 1957, 1960) konnte ermittelt werden, daß Sonnenblumenwurzeln bei Anwendung steriler Wasserkultur recht zahlreiche Aminosäuren und Amide an das Substrat abgeben, und zwar fast ausnahmslos aus lebenden Zellen, deren Stoffwechsel diesen Vorgang steuert. Besonders die Versuche mit *Neurospora crassa*-Defektmutanten, aber auch papierchromatographische Analysen, hatten gezeigt, daß Valin und Leucin vornehmlich von der jungen Wurzelhaarregion der Sonnenblumenwurzeln abgegeben werden, und daß die Calyptra dieser Pflanzen vom Mycel der Leucine-less-Mutante des Pilzes sogar überhaupt nicht umsponnen wird. Im Gegensatz hierzu scheiden junge Sonnenblumenwurzeln Asparagin und Threonin besonders stark in der Wurzelspitze, der Streckungszone und dem Bereich der gerade beginnenden Wurzelhaarentstehung aus.

Ganz anders liegen die Verhältnisse bei der Erbse. Zwar konnte auch bei diesem Objekt mit Hilfe des biologischen Testverfahrens festgestellt werden, daß die Wurzeln Asparagin, Valin, Leucin und Threonin an die wäßrige Nährlösung abgeben. Aber die insgesamt 37 Versuche mit 220 Pflanzen zeigten, daß bei etwa 10—14 Tage alten Erbsenpflanzen die erwähnten Substanzen nahezu ausnahmslos nur von der Calyptra, alten, braun werdenden Wurzeln und von der gealterten Wurzelhaarregion abgegeben werden. Lediglich im Falle des Threonins ist auch die Streckungszone der Wurzeln an der Abgabe beteiligt. Niemals konnte ein nennenswerter Pilzbefall, der auf eine Substanzabgabe schließen läßt, in der Region der jungen und der sich gerade entwickelnden Wurzelhaare festgestellt werden, und Asparagin, Valin sowie Leucin wurden nie in der Streckungszone ausgeschieden.

Diese Beobachtungen lehren somit, daß den Erbsenwurzeln unter den gewählten Versuchsbedingungen die geprüften Substanzen im Gegensatz zu den bei den Sonnenblumenwurzeln herrschenden Verhältnissen bevorzugt aus bereits geschwächten oder absterbenden Zellen entweichen, so daß dieser Vorgang außer infolge einer Reabsorption der abgegebenen Substanzen durch lebende Wurzelzellen kaum vom Stoffwechsel lebender Zellen gesteuert werden kann.

*2. Die Abgabe bestimmter Aminoverbindungen durch die Wurzeln von Helianthus annuus und Pisum sativum an einen Modellboden*

Wie bereits erwähnt, wurden vergleichende Untersuchungen über die Entwicklung des Pilzmycels als Maß für die von den Wurzeln der höheren Pflanze abgegebenen Substanzmengen, sowie als Hinweis auf den Ort der Substanzabgabe unter den Verhältnissen der sterilen Wasserkultur und der Sterilkultur auf einem Glasperlen-Boden durchgeführt. Ziel dieser Experimente war es, angesichts der einander vielfach widersprechenden Literaturangaben, in der ersten Versuchsreihe Aufschluß darüber zu gewinnen, ob die Substanzabgabe durch die Wurzeln von Vertretern verschiedener höherer Pflanzenarten in beiden Substraten artspezifisch jeweils nach denselben bzw. voneinander abweichenden Prinzipien erfolgt. Andererseits war in der zweiten Versuchsreihe zu prüfen, ob in einem mineralischen „Boden" die Stoffabgabe selbst verringert wird, oder ob die starke Oberflächenentwicklung des Substrates über den Umweg der wesentlich vergrößerten adsorptiven Bindung der abgegebenen organischen Substanzen eine herabgesetzte Abgabe der geprüften Stoffe im mineralischen „Boden" nur vortäuscht.

In der zuerst durchgeführten Versuchsreihe (59 Einzelversuche, jeder aus je einer Pflanze auf Perlenkultur und auf Wasserkultur bestehend) wurde am Ort des Mycelwachstums auf den Wurzeln deutlich, daß die Abgabe von Asparagin, Valin, Threonin und Leucin durch die Wurzeln von *Helianthus annuus* bei Anwendung der Perlenkultur an denselben Stellen erfolgt, wie in der Wasserkultur. Auch in dem „Modellboden" wurden die geprüften Aminoverbindungen demnach von lebenden Zellen der Sonnenblumenwurzeln abgegeben, aber das Pilzwachstum war in dem „Modellboden" außerordentlich viel schwächer als in der Wasserkultur, obwohl beide Substrate reichlich mit Conidiosporen beimpft worden waren.

Aus den Erbsenwurzeln, deren Substanzabgabe, wie oben dargestellt wurde, bei der Wasserkultur im Gegensatz zu den Verhältnissen bei *Helianthus annuus* im wesentlichen aus geschwächten, absterbenden und toten Zellen erfolgte, entwichen die geprüften Aminoverbindungen bei Kultur der Pflanzen auf dem Glasperlen-„Boden" ebenfalls nur den geschwächten bzw. absterbenden und toten Zellen der Calyptra, der alten Wurzelhaarregion, sowie alter brauner Wurzeln. Auch in diesem Falle war das Pilzwachstum der Perlenkulturen im Vergleich zu demjenigen der Wasserkultur sehr gering und entzog sich vielfach vollständig der Beobachtung, obwohl das Substrat ausreichend beimpft worden war.

Die erwähnten Versuche, bei denen niemals Bilder beobachtet werden konnten, die von den beschriebenen Erscheinungen abwichen, hatten

somit gezeigt, daß in der Perlenkultur weder bei *Helianthus annuus* noch bei *Pisum sativum* andere Zellbereiche die abgegebenen organischen Stoffe liefern als in der Wasserkultur der betreffenden Pflanzenarten, wohl aber, daß bei Kultur beider Versuchspflanzenarten auf einem „Modellboden" ganz wesentlich geringere abgegebene Substanzmengen nachweisbar sind als bei Anwendung der Wasserkultur. Bei genauer Analyse des Pilzwachstums in den Perlenkultur-Rohren zeigte es sich jedoch, so besonders im Falle der Valine-less-Mutante auf Erbsenkulturen, daß bisweilen zusätzlich zu den die Wurzeln stellenweise umgebenden Hyphen ein sehr lockeres Hyphengeflecht einen größeren Raum des Perlen-„Bodens" durchspann. Diese Beobachtung ließ vermuten, daß die Abgabe der Aminoverbindungen durch die Wurzeln im Modellboden keineswegs so gering ist, wie das Ausmaß des Pilzwachstums auf den Wurzeln vermuten läßt, sondern daß beträchtliche Substanzmengen adsorptiv an den „Bodenpartikeln" eines größeren Bodenvolumens gebunden werden und damit dem Pilzwachstum nicht mehr ohne weiteres zur Verfügung stehen. Hierauf läßt auch die Überlegung schließen, daß absterbende oder sehr gealterte Wurzelzellen der Erbsen bei der Perlenkultur kaum beträchtlich weniger Substanzen abgeben werden als in der Wasserkultur.

Um die Bedeutung der Adsorption für die erwähnten Unterschiede im Pilzwachstum der Perlenkulturrohre gegenüber denjenigen der Wasserkulturrohre zu ermitteln, wurden in der zweiten Versuchsreihe Experimente durchgeführt, bei denen die von den Wurzeln der Versuchspflanzen in das wäßrige Substrat bzw. in den Modellboden abgegebenen Substanzen extrahiert und zur Bereitung des Nährbodens für Pilzkulturen verwandt wurden, deren Myceltrockengewicht nach achttägiger Kultur bei 22—25° C als relatives Maß der aus den Wurzeln in die beiden Substratarten entwichenen Substanzmengen diente (Methodik S. 446).

Bei der Herstellung der beiden Nährböden für die Valine-less-Mutante, die im folgenden ausnahmslos verwandt wurde, waren geringe Unterschiede in der Nährsalzkonzentration der aus der Perlen- und der Wasserkultur gewonnenen Extrakte unvermeidlich. Es wurde versucht, wie oben beschrieben ist, diese Unterschiede weitgehend auszugleichen. Außerdem muß berücksichtigt werden, daß die verwandten Pilzstämme gegen Unterschiede in der Nährsalzkonzentration des Substrats in weiten Grenzen unempfindlich sind (Ryan, Beadle und Tatum 1943), so daß die tatsächlich aufgetretenen geringen Differenzen das Pilzwachstum beider Nährlösungsvarianten kaum beeinträchtigt haben dürften. Eine weitere Fehlerquelle erwächst daraus, daß die Wurzeln aus dem Perlen-„Boden" herausgezogen werden müssen, bevor die Extrakte hergestellt werden können. Es wäre möglich, daß hierbei wesentlich mehr Wurzelhaare geschädigt werden als bei Entfernung der Wurzeln aus der Wasserkultur. Eine mikroskopische Überprüfung zeigte jedoch, daß diese Fehlerquelle vernachlässigt werden kann, da einerseits die Hohlräume zwischen den leicht beweglichen Perlen sehr groß sind und da die Perlen andererseits wegen ihrer Größe von den Wurzelhaaren nicht umsponnen werden können.

Die auf dem Modellboden gezogenen Erbsen und Sonnenblumen wachsen innerhalb des Versuchszeitraumes von etwa 5—6 Tagen nicht so stark wie diejenigen der Wasserkultur. Dies trifft sowohl für die Sprosse, als auch für die Wurzeln zu. Dennoch ist die aus den beiden Substraten extrahierbare Substanzmenge absolut, auf jeden Fall aber relativ gleich groß, oder meist sogar in der Perlenkultur höher als bei der Wasserkultur, wie aus den Werten des Trockengewichtes der auf den Extrakten beider Substratarten kultivierten Mycelien der Valine-less-Mutante von *Neurospora crassa* geschlossen werden kann (als Beispiel vgl. die Tabelle).

Tabelle. *Frischgewicht von je acht Versuchspflanzen und relative Menge des von den Wurzeln dieser Pflanzen abgegebenen Valins nach etwa sechstägiger Kultur auf wäßriger Nährlösung bzw. auf dem Modellboden*

| Nr. des Versuches | Versuchspflanze | Substrat | Frischgewicht | | Trockengewicht des Mycels der Valine-less-Mutante |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 8 Sprosse g | 8 Wurzeln g | g |
| 2 | *Pisum sativum* | Wasserkultur | 3,660 | 4,590 | 0,1785 |
| | | Perlenkultur | 3,350 | 3,210 | 0,2146 |
| 3 | *Pisum sativum* | Wasserkultur | 3,900 | 4,020 | 0,0888 |
| | | Perlenkultur | 3,600 | 3,890 | 0,1123 |
| 1 | *Helianthus annuus* | Wasserkultur | 5,980 | 3,065 | 0,2195 |
| | | Perlenkultur | 5,140 | 2,520 | 0,1710 |

Die in der Tabelle aufgeführten, sowie die ergänzenden sechs Versuche können leider nicht statistisch ausgewertet werden, da das Alter, mit dem die Versuchspflanzen auf die Kulturrohre gepflanzt wurden, nicht genau gleich war, sondern aus technischen Gründen um einige Tage schwankte. Alle Versuche lassen jedoch mit großer Deutlichkeit stets dasselbe Prinzip erkennen: Die aus den beiden Substratarten extrahierbare Substanzmenge ist bei Anwendung beider Kulturverfahren, nämlich der Wasserkultur und der Perlenkultur mehr oder weniger gleich groß, bzw. im Falle der Perlenkultur sogar meist um 20% höher als in der Wasserkultur, obwohl mit dem früher erwähnten biologischen Testverfahren in den durchwurzelten Kulturrohren bei der Perlenkultur ganz beträchtlich geringere Mengen von Aminosäuren nachgewiesen werden konnten, die den Pilzen zur Verfügung stehen, als im Falle der Wasserkulturen.

## D. Diskussion

Eingangs wurde darauf hingewiesen, daß gegenwärtig keine einhellige Meinung darüber besteht, ob die den Wurzeln der verschiedensten Pflanzenarten entweichenden organischen Substanzen aus lebenden und

vitalen Wurzelzellen stammen (ROVIRA 1956[1]; MARTIN 1956, 1957, 1958; EBERHARDT und MARTIN 1957; FRENZEL 1957, 1960), oder ob sie vielmehr von absterbenden bzw. toten Zellen geliefert werden (BÖRNER 1956; MARTIN und RADEMACHER 1960; KATZNELSON, ROUATT und PAYNE 1954, 1955). Die hier beschriebenen Versuche lehren jedoch, daß keine allgemeingültigen Aussagen über den Lebenszustand der die Substanzen abgebenden Zellen bei Wurzeln verschiedener Pflanzenarten gemacht werden können, da artspezifische Unterschiede in der Art und Weise der Substanzabgabe bestehen; denn Jungpflanzen von *Helianthus annuus* geben die geprüften Aminoverbindungen aus lebenden Wurzelzellen und unter ständiger Kontrolle dieses Vorganges durch den Stoffwechsel der einzelnen Zelle, wie auch der gesamten Pflanze ab, wohingegen den Wurzeln von *Pisum sativum* dieselben Substanzen absterbenden und toten Zellen entweichen.

Die Tatsache, daß bei Sterilkultur der Versuchspflanzen auf mineralischen Böden nur außerordentlich geringe Mengen organischer Substanzen im Boden nachweisbar sind, könnte den Eindruck erwecken, als fände im Boden (im Gegensatz zur Wasserkultur) überhaupt keine nennenswerte Abgabe organischer Verbindungen aus den Wurzeln höherer Pflanzen statt. Die auf S. 450 beschriebenen Versuche zeigten jedoch, daß unter den gewählten Bedingungen bei Erbsen- und Sonnenblumenkulturen mehr oder weniger gleichgroße Mengen Valin aus dem Modellboden und aus dem als Kontrolle verwandten wäßrigen Substrat extrahiert werden können. Früher (FRENZEL 1957, 1960) wurde darauf aufmerksam gemacht, daß junge Sonnenblumenwurzeln innerhalb einer sechstägigen Sterilkultur auf Knopscher Nährlösung ungefähr gleichgroße Aminosäuremengen an die Nährlösung abgeben, wie gleichzeitig in der gesamten Wurzel in „freier" Form vorhanden sind. Hieraus wurde geschlossen, daß den wenigen abgestorbenen Calyptra- und Wurzelhaarzellen keine Bedeutung bei der Anreicherung der betreffenden Substanzen im Wurzelraum lebender Pflanzen zukommt. Die Richtigkeit dieser Schlußfolgerung wurde durch die Lokalisation des Ortes der Stoffabgabe mit dem biologischen Testverfahren bestätigt. Da nun bei den hier geschilderten Versuchen mit *Helianthus annuus* die aus dem Glasperlenboden extrahierbare Valinmenge mehr oder weniger derjenigen glich, die aus der wäßrigen Nährlösung gleichalter Pflanzen der Wasserkulturen

[1] Im Gegensatz zu den hier vorgetragenen Versuchsergebnissen nahm ROVIRA an, daß die den Erbsenwurzeln entweichenden organischen Substanzen aus lebenden Zellen stammen, da bei 21tägiger Kultur der Pflanzen die Menge toter Zellen, die im Bodenextrakt nachweisbar ist, doppelt so groß wie die bei zehntägiger Kultur sei, die Menge der abgegebenen organischen Substanzen sich aber nur um 50% erhöht habe. Hierbei ist aber offenbar die Möglichkeit der Reabsorption der einmal abgegebenen Stoffe durch andere Wurzelzellen übersehen worden, so daß eher vermutet werden muß, daß auch bei ROVIRAs Versuchen die erwähnten organischen Substanzen aus geschwächten oder toten Zellen der Erbsenwurzeln stammen.

gewonnen wird, kann die nach Entfernung der Versuchspflanzen aus dem Glasperlenboden mit Alkohol extrahierbare Valinmenge nicht abgestoßenen und in den Kulturrohren zurückgebliebenen Calyptrazellen entstammen, die bei der Alkoholextraktion zerstört werden. Dasselbe trifft auch für die Versuche mit Erbsen zu. Die aus dem „Boden" mit Alkohol extrahierbare Menge organischer Substanz muß somit bereits vorher von der Wurzel abgegeben worden sein. Da diese Menge im Glasperlenboden und in der wäßrigen Nährlösung mehr oder weniger gleich groß war und da andererseits im bewurzelten Glasperlenboden im Gegensatz zur wäßrigen Nährlösung nur ein außerordentlich geringes Pilzwachstum zu beobachten war, muß geschlossen werden, daß die Höhe der Substanzabgabe zwar in den beiden Substraten mehr oder weniger gleich groß ist, daß aber im Glasperlenboden infolge der stark vergrößerten Oberfläche der größte Teil der von den Wurzeln abgegebenen Stoffe adsorbiert und damit anderen Organismen entzogen wird.

Die bisher zum Problem der „Wurzelausscheidungen" durchgeführten Versuche haben gezeigt, daß die Wurzeln der einzelnen Pflanzenarten sehr verschiedene organische Verbindungen abzugeben vermögen (Literatur bei BÖRNER 1960; FRENZEL 1960; RADEMACHER 1959). Diese Stoffe, deren Menge noch durch episodisches Welken der Wurzelhaare (EBERHARDT und MARTIN 1957; KATZNELSON, ROUATT und PAYNE 1954, 1955) kurzfristig vergrößert werden kann, sind, wie die vorliegenden Experimente deutlich gemacht haben, jedoch nach Freisetzung aus den Wurzelzellen den Gesetzen der Adsorption an die Bodenpartikel unterworfen (vgl. hierzu HOFFMANN 1959; GREENWOOD und LEES 1960; WINTER und BRÜSEWITZ 1960), so daß sie zunächst zu einem gewissen Grade aus dem Stoffkreislauf ausgeschaltet werden. Es ist allerdings zu vermuten, daß auch diese adsorbierten Stoffe schließlich durch Austauschadsorption erneut von den Organismen selektiv genutzt werden können, wobei höhere Pflanzen und Mikroorganismen der Rhizosphäre gleichermaßen beteiligt sein dürften. Wenn auch der Vorgang der Stoffabgabe selbst experimentell untersucht werden kann, so entgleitet hiermit aber das Problem der durch Wurzel-„Ausscheidungen" verursachten allelopathischen Erscheinungen infolge des komplizierten Wechselspiels zwischen adsorbierenden Bodenpartikeln und den den Boden bewohnenden Organismen wahrscheinlich noch lange der exakten kausalanalytischen Forschung.

## Zusammenfassung

Die in Ergänzung zu früheren Arbeiten durchgeführten Untersuchungen lehrten folgendes:

1. Es ist nicht möglich, für alle Arten höherer Pflanzen gleichermaßen zutreffende Angaben über den Lebenszustand derjenigen Wurzelzellen

zu machen, die verschiedene organische Verbindungen an das Nährmedium abgeben; denn Sonnenblumenwurzeln scheiden mehrere Aminoverbindungen unter reger Beteiligung des Stoffwechsels aus lebenden Wurzelzellen aus, Erbsenwurzeln geben diese Stoffe hingegen aus absterbenden und toten Zellen ab.

2. Die geschilderten artspezifischen Unterschiede in der Herkunft der von den Wurzeln abgegebenen Substanzen treffen sowohl für die Kultur der Pflanzen auf einer wäßrigen Nährlösung, als auch in einem aus Glasperlen bestehenden Modellboden zu.

3. Die von den Wurzeln an den Modellboden abgegebene Menge Valin (wahrscheinlich aber auch weiterer organischer Substanzen) ist derjenigen gleich, die von gleichalten Wurzeln der Versuchspflanzen in der wäßrigen Nährlösung produziert wird. Im Boden werden jedoch die betreffenden Stoffe durch Adsorption an Bodenpartikeln gebunden, so daß der Eindruck des Fehlens einer Abgabe dieser Verbindungen im Boden erweckt wird.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei sehr herzlich für ihre Unterstützung der Versuche gedankt.

## Literatur

BÖRNER, H.: Die Abgabe organischer Verbindungen aus den Karyopsen, Wurzeln und Ernterückständen von Roggen (*Secale cereale* L.), Weizen (*Triticum aestivum* L.) und Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und ihre Bedeutung bei der gegenseitigen Beeinflussung der höheren Pflanzen. Beitr. Biol. Pflanz. **33**, 33—83 (1956).

— Liberation of organic substances from higher plants and their role in the soil sickness problem. Bot. Rev. **26**, 393—424 (1960).

EBERHARDT, F., u. P. MARTIN: Das Problem der Wurzelausscheidungen und seine Bedeutung für die gegenseitige Beeinflussung höherer Pflanzen. Z. Pflanzenkr. **64**, 193—205 (1957).

FRENZEL, B.: Zur Abgabe von Aminosäuren und Amiden an das Nährmedium durch die Wurzeln von *Helianthus annuus* L. Planta (Berl.) **49**, 210—234 (1957).

— Zur Ätiologie der Anreicherung von Aminosäuren und Amiden im Wurzelraum von *Helianthus annuus* L. Planta (Berl.) **55**, 169—207 (1960).

GREENWOOD, D. J., and H. LEES: Studies on the decomposition of amino acids in soils. II. The anaerobic metabolism. Plant and Soil (Den Hague) **12**, 69—80 (1960).

HOFFMANN, G.: Verteilung und Herkunft einiger Enzyme im Boden. Z. Pflanzenernähr. Düng. u. Bodenk. **85** (**130**), 97—104 (1959).

KATZNELSON, H., I. W. ROUATT and T. M. B. PAYNE: Liberation of amino acids by plant roots in relation to desiccation. Nature (Lond.) **174**, 1110—1111 (1954).

— — — The liberation of amino acids and reducing compounds by plant roots. Plant and Soil (Den Hague) **7**, 35—48 (1955).

MARTIN, P.: Qualitative und quantitative Untersuchungen über die Ausscheidung organischer Verbindungen aus den Keimwurzeln des Hafers (*Avena sativa* L.). Naturwissenschaften **43**, 227—228 (1956).

Martin, P.: Die Abgabe von organischen Verbindungen, insbesondere von Scopoletin, aus den Keimwurzeln des Hafers. Z. Bot. **45**, 475—506 (1957).

— Einfluß der Kulturfiltrate von Mikroorganismen auf die Abgabe von Scopoletin aus den Keimwurzeln des Hafers (*Avena sativa* L.). Arch. Mikrobiol. **29**, 154 bis 168 (1958).

—, u. B. Rademacher: Untersuchungen zur Frage der Wurzelallelopathie von Kulturpflanzen und Unkräutern. Beitr. Biol. Pflanz. **35**, 213—237 (1960).

Rademacher, B.: Gegenseitige Beeinflussung höherer Pflanzen. In W. Ruhland, Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 11, S. 655—706. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959.

Rovira, A. D.: Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect. I. The nature of root exudate from oats and peas. Plant and Soil (Den Hague) **7**, 178 bis 194 (1956).

Ryan, F. J., G. W. Beadle and E. L. Tatum: The tube method of measuring the growth rate of *Neurospora*. Amer. J. Bot. **30**, 784—799 (1943).

Winter, A. G., u. G. Brüsewitz: Untersuchungen über die Aufnahme organischer Substanzen durch die Wurzeln höherer Pflanzen. V. Anreicherung und Stabilität einiger organischer Verbindungen im Boden. Naturwissenschaften **47**, 139 (1960).

Priv.-Doz. Dr. B. Frenzel,
Botanisches Institut der Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau der Technischen Hochschule München, Freising-Weihenstephan

Planta 57, 455—462 (1961)

Aus der Cytologischen Abteilung der Forschungsanstalt für Heilpflanzen, Prag

# EINIGE ERGEBNISSE ÜBER DEN EINFLUSS VON GERMANIN (BAYER 205) AUF DIE PFLANZLICHE ZELLE

Von

P. MILOVIDOV

Mit 28 Textabbildungen

*(Eingegangen am 23. Juli 1961)*

## Einleitung

Germanin („Bayer 205", „Suramin", „Belganyl", „Antropyl", „Moranyl", „Naganol", „Fourneau 309") oder Karbamid-m-amino-benzolyl-m-amino-p-toluyl-1-naphthylamin-4,6,8-trisulfonan-Na ist ein chemotherapeutisches Mittel, das gegen die Schlafkrankheit, Pemphigus u.a. mit Erfolg angewendet wird. Es inhibiert die Trypanosomen-Vermehrung und hat eine Reihe von interessanten physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften, es schützt z.B. einige Eiweißstoffe (Albumin, Kasein, Pepton) gegen Fällung durch Wärme, Sublimat und Tannin, verhindert bei Seeigeleier die Befruchtung und die Bildung der Befruchtungsmembran usw. In saurer Lösung werden dieselben Eiweißstoffe jedoch durch das Germanin selbst ausgefällt. Im Gegensatz dazu fallen die Globuline bei Sublimatzusatz zu den germaninhaltigen Lösungen aus (JÍROVEC und KOCIÁN 1930, JÍROVEC 1943a, b). JÍROVEC hat gefunden, daß sogar ziemlich konzentrierte Germaninlösungen (1:50, 1:100) im Laufe von 6—8 Std keinen Einfluß auf die Eier von *Paracentrotus lividus* ausüben, aber schon nach 24 Std wird das Protoplasma stärker vacuolisiert als in den Kontrollen, wobei einige Eier zerfallen. Für freilebende Infusorien sind sogar hohe Konzentrationen (2%) nicht giftig. Nach der Befruchtung solcher Eier mit frischem Sperma zeigte sich aber an den Schnitten, daß die so vorbehandelten Eier durch beide Germaninkonzentrationen schon nach kurzer Zeit schwer geschädigt sind: Es sind ziemlich viele mehrpolige Mitosen zu finden (JÍROVEC 1943b, Abb. 4, Konzentration 0,01%), so daß später die Eier zahlreiche Kerne besitzen, ohne sich jedoch in die einzelnen Blastomeren zu teilen. Nach einigen Stunden gehen die Eier ein. Bei *Paracentrotus lividus* und *Sphaerechinus granularis* sind bei der Konzentration 1:500, 1:1000 und 1:2000 nach 6—8 Std keine Mitosen zu finden, bei der Konzentration 1:3000 (2—3 Std) sind dieselben zu sehen, aber die Mehrzahl der Eier teilt sich nicht. Bei der Konzentration 1:6500 (2 Std) wurden viele normale Teilungen, aber auch zwei- und mehrpolige Mitosen gefunden. Bei der Konzentration 1:10000 ist die Befruchtung normal, die Teilung aber verzögert, da viele Eier drei- und mehrpolige Figuren besitzen.

Die Bildung der Befruchtungsmembran und die Furchung finden nach der Einwirkung von Germanin in Konzentrationen von 1:50 bis 1:5000 nicht statt, wohl aber in der Konzentration 1:10000. Wurden die befruchteten Eier nach 1 min in 1:500 Germaninlösung übergeführt, so furchen sich nur 60%, andere haben keine Befruchtungsmembran. Die 3 min nach Befruchtung übertragenen Eier furchen sich zu 90%, die nach 6 min übertragenen verhalten sich normal. In den Präparaten der Eier, die 3—6 min (in einigen Fällen 3 Std) nach der Befruchtung in 1:500 Germaninlösung übergeführt wurden, kann man Verspätung und selbst Ausbleiben der Furchung und viele anomale Mitosen beobachten. In solchen, die 10 min bis einige Stunden nach der Befruchtung in Germaninlösung übertragen wurden, fanden sich normale Blastulae. Die Konzentration von Germanin, die die Befruchtung hemmt, übt also keinen weiteren Einfluß auf die normal befruchteten Eier aus.

Es war nun von Interesse, den Einfluß des Germanins auf die pflanzliche Zelle zu untersuchen.

## Experimenteller Teil

### A. Material und Methoden

Junge Keimwürzelchen von *Vicia faba* wurden mit dem Samen zusammen in einer 0,5% wäßrigen Lösung des Germanins eingetaucht, in dem sie 6, 24 oder 50 Std liegen blieben. Dann wurden sie nach dem Abspülen mit destilliertem Wasser entweder sofort mit Nawaschin's Gemisch fixiert oder in feuchte Sägespäne übertragen, wo sie vor der Fixierung noch 24 Std lang weiter wachsen konnten. Die Kontrollen blieben 24 Std im destillierten Wasser und wurden dann für 48 Std in feucht gehaltenes Sägemehl übertragen. Die Zahl der Versuchsobjekte war in jedem Fall 4—6. Die Färbung der Serienmikrotomschnitte wurde mit Heidenhainschem Eisenhämatoxylin bei eventueller Nachbehandlung mit 1%iger wäßriger Eosinlösung durchgeführt, einige Schnitte wurden mit Feulgenschem Reagens bei eventueller Nachfärbung mit 1%iger Lichtgrünlösung (in 70%igem Alkohol) behandelt. Im ganzen wurden 6 Versuchsserien durchgeführt: bei 6 Std Germaninwirkung, 6 Std Einwirkung + 24 Std Verweilen der Objekte unter normalen Bedingungen, bei 24 Std Germaninwirkung, 25 Std Germaninwirkung + 24 Std Wachstum im Sägemehl, 50 Std Germaninwirkung und 50 Std Wirkung + 24 Std Verweilen in Sägespänen. Kontrollversuch: 24 Std im Wasser + 48 Std unter normalen Bedingungen. Die Vorkeimung der Bohnen fand entweder in feuchten Sägespänen oder im Wasser (Versuch 5 und 6, Kontrolle) statt. Der $p_H$-Wert der Germaninlösungen und des dest. Wassers betrug 5,5.

### B. Ergebnisse und ihre Besprechung

*Nach 6stündiger Einwirkung des Germanins* und nachfolgender Fixierung wurden im Wurzelgewebe wenige mitotische Figuren, hauptsächlich späte Prophasestadien mit dicken Chromosomen gefunden. Wenn die Wurzelspitzen nach *6stündiger Einwirkung des Germanins 24 Std lang in Sägespänen* weiter wuchsen, so erscheinen die mitotischen Figuren in normaler Zahl oder sie konnten auch ganz fehlen. Hier wurden außerdem zweikernige Zellen, Kernverschmelzungen in der Interphase

und Prophase, polyploide Kerne, weiterhin Mitosen mit unregelmäßig verteilten und gekrümmten Chromosomen gefunden (Abb. 8, 20, 21, 23, 25). Diese Erscheinungen wurden in 2 von 5 Wurzeln gefunden, die Zahl der Kernabnormitäten war etwa 50 pro Objekt. Bei *24stündiger Einwirkung des Germanins* wurden wenige normale mitotische Figuren neben einzelnen Spiremen mit den dicken Chromosomen und einigen polyploiden Zellkernen gefunden. Hier zeigten $^1/_4$ der Objekte Kernabnormitäten. Die Zellkerne waren oft den beiden Seiten der Querwand dicht angeschmiegt. In den Wurzelzellen wurden Niederschläge, besonders in den degenerierenden Pleromzellen festgestellt. Die Zahl der Abnormitäten war niedrig. Ihr Anteil nahm aber *in der nachfolgenden 24stündigen Wachstumsperiode* in Sägespänen bedeutend zu (bis 150 pro Wurzel). Die Frequenz der Abnormitäten war hier 4/5 (80%). Neben vielen normalen mitotischen Figuren wurden folgende Abweichungen in den Dermatogen-, Periblem-, seltener auch in Pleromzellen gesehen:

*1. Zweikernige Zellen mit* Inter-, Pro- und Metaphasenkernen; dabei können die Zellkerne frei in gewissem Abstand voneinander oder eng aneinander liegen (Abb. 17, 18, 19, 22, 26).

*2. Verschiedene Stadien von Kernverschmelzung* im Laufe der Inter-, Pro- und Metaphase.

*a) Interphase.* Man erkennt verschiedene Verschmelzungsstadien zweier oder mehrerer Zellkerne von gleicher oder ungleicher Größe zu einem Kern verschiedener Form und Größe (Abb. 24, 27, 28); dabei sind die Verschmelzungsgrenzen oft gut, gelegentlich aber fast nicht zu unterscheiden.

*b) Prophase.* Die Zellkerne befinden sich in frühen oder späten Prophasen und können frei oder dicht aneinander liegen; dabei verschmelzen sie nicht selten (Abb. 1, 3, 4, 19, 21). Ein sehr interessantes Bild ist in Abb. 16 dargestellt: hier sind zwei Spiremkerne miteinander durch einen sehr feinen Chromatinfaden verbunden. Man kann die Entstehung dieser Figur so deuten, daß in einer zweikernigen Zelle beide Kerne simultan die gleiche Teilungsphase erreicht hatten, sich dabei wahrscheinlich berührten und dann während des Zellwachstums wieder voneinander getrennt wurden, so daß sie mit einer Chromatide im Zusammenhang blieben.

*c) Metaphase.* Die Äquatorialplatten liegen frei oder sie bilden eine gemeinsame Teilfigur (Abb. 2, 5, 6, 7, 11).

*3.* Eine weitere Abnormität sind *eigenartige „Bouquetstadien"*. Oft sind solche Figuren in verschiedenen Phasen zu finden, in denen einzelne Chromosomen weit über die Grenzen der Figuren hinausragen, wobei sie bogen- bzw. schlingen- oder maschenartig aussehen. Eine solche Chromosomenumordnung deutet auf Funktionsstörungen der achromatischen Spindel bzw. auf Chromosomen-Aberrationen (Abb. 2, 7, 8, 9, 14, 15).

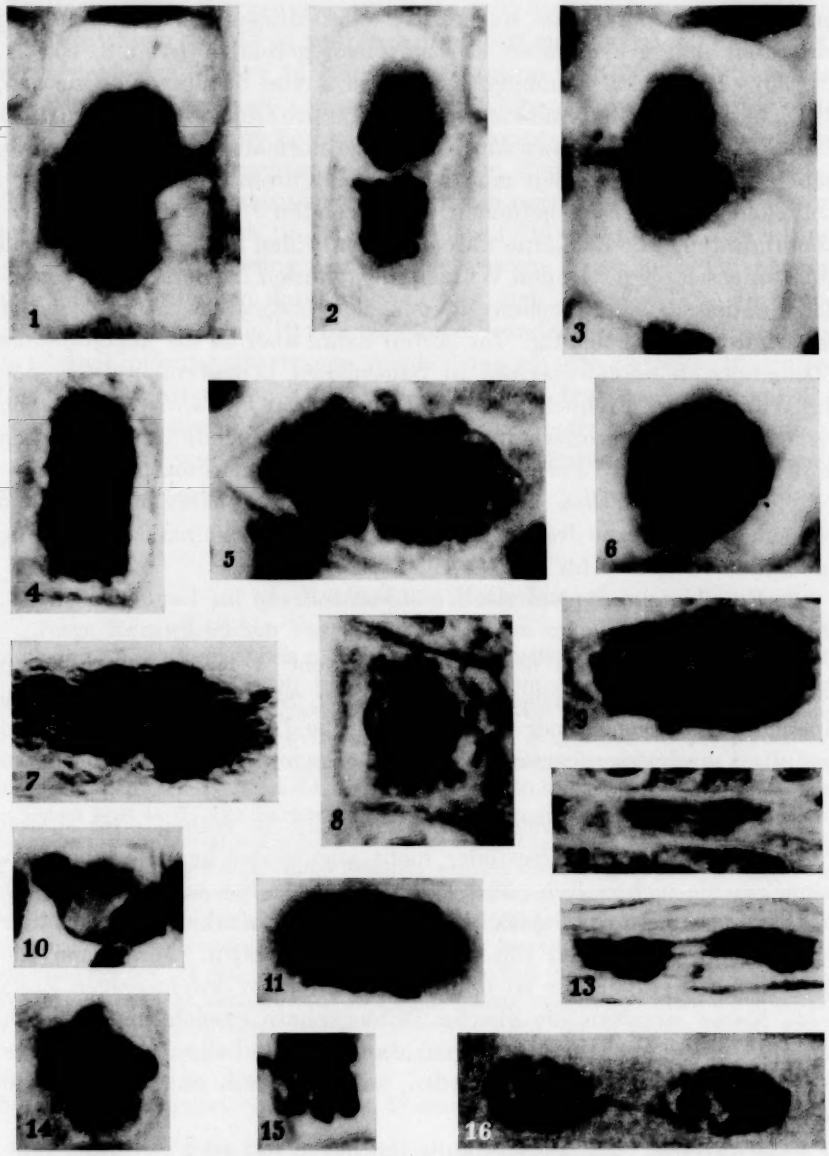



Abb. 1—28. Keimwurzeln von *Vicia faba*. Objektiv: Meopta 45 × (Abb. 16: Zeiß Apochromat HI 90 ×), Okular: Leitz Periplan 8 ×. Negativ-Vergrößerung 330 × bzw. 660 ×. Bei der Reproduktion verschieden stark vergrößert. Photo A. SUCHÁ-BEDÁŠOVÁ. Färbung: Abb. 16 Feulgen + Lichtgrün, Abb. 5, 10, 14 Heidenhain + Eosin, alle anderen Heidenhain. Abb. 24, 30: Pleromzellen, alle anderen: Periblemzellen. Abb. 8, 20, 21, 23, 25: 6stündige Einwirkung von Germanin + 24 Std Wachstum; alle anderen: 24 Std Einwirkung + 24 Std Erholung. Vergrößerung: Abb. 22, 27, 28 560 ×, Abb. 5 1060 ×, Abb. 7, 13 1125 ×, Abb. 6, 9 1250 ×, Abb. 16 1900 ×, alle anderen: 960 ×

Abb. 1. Verschmelzung der Prophasenkerne. Zellwand nur teilweise gebildet

Abb. 2. Zwei Metaphasenkerne in einer Zelle

(Legenden der Abb. 3—16 auf gegenüberliegender Seite)

*4. Polyploide Zellkerne* von verschiedenem Polyploidiegrad, verschiedener Größe und Form in verschiedenen Phasen mit mehreren Kernkörperchen (Abb. 24, 27, 28).

Oft liegen die Zellkerne in den Tochterzellen an beide Seiten der neugebildeten Querwand dicht angeschmiegt, so daß sie den Eindruck von verschmolzenen Zellkernen machen. Bei stärkerer Vergrößerung wird es aber klar, daß sie durch eine Wand getrennt sind, die aber nicht immer gut ausgebildet ist. In zahlreichen anderen Fällen kann aber die echte Kernverschmelzung in verschiedenen Teilungsphasen vor sich gehen, wobei die Querwand sich nur von einer Seite unvollkommen bildet und nicht die andere Seite der Mutterzellmembran erreicht. Diese Zelle bleibt also zweikernig oder die Zellkerne verschmelzen so, daß sie in der Mitte oder an der Seite der Zelle bleiben. Die Querwandreste können dabei verschiedene Lage einnehmen (Abb. 1, 3, 21, 24, 27, 28). Die Bilder sind typisch genug, in einigen Fällen hat man den Eindruck, daß solche Zellwandreste das Verschmelzen der Tochterkerne nicht verhindern können.

Vielleicht ist es zulässig, einen gewissen Parallelismus zwischen der Hemmung der Bildung einer Befruchtungsmembran bei Seeigeleiern und der der Querwand in den pflanzlichen Zellen unter dem Einfluß von Germanin zu suchen. Die Querwand bildet sich bei der Mehrzahl der höheren Pflanzen von der Mitte aus zentrifugal, so daß ihre jüngsten Teile an der Zellperipherie liegen. Nach Priestley (1923, zit. Němec 1930, S. 198) enthalten die jungen Querwände neben Pektin auch Eiweißstoffe. Gegenwärtig ist wohl bereits definitiv bewiesen, daß die primäre pflanzliche Zellwand Protein enthält. Den endgültigen Nachweis dafür haben Tripp et al. (1951, zit. Roelofsen 1959) erbracht, denen es gelungen ist, die primären Zellwände ausgewachsener Baumwollhaare von den sekundären Schichten durch ein mechanisches Verfahren zu trennen, anzusammeln und in ihnen bis zu 12—17% Protein aufzuzeigen. Gerade solche zentral liegende junge eiweißhaltige Querwandanlagen können unter dem Einfluß von Germanin nicht mehr koagulieren, wodurch die Verschmelzung beider sich berührenden Tochterkerne begünstigt wird. Wirkt das Germanin auf die jüngsten peripheren Zellwandteile, so entstehen zweikernige Zellen von verschiedenem Typus (s. Abbildungen). Vielleicht kann man diesen Vorgang mit der

Abb. 3. Kernverschmelzung in der Prämetaphase. Zellwand nur teilweise gebildet

Abb. 4. Volle Verschmelzung der Spiremkerne

Abb. 5 u. 6. Polyploide Äquatorialplatten

Abb. 7—9 u. Abb. 14. Metaphasenfiguren mit schlingenförmigen Chromosomenausstülpungen

Abb. 10, 12, 13. Chromosomenbrücken

Abb. 11, 15. Unregelmäßige Metaphasenfiguren, Abb. 11 polyploide Figur

Abb. 16. Prophasenbrücke

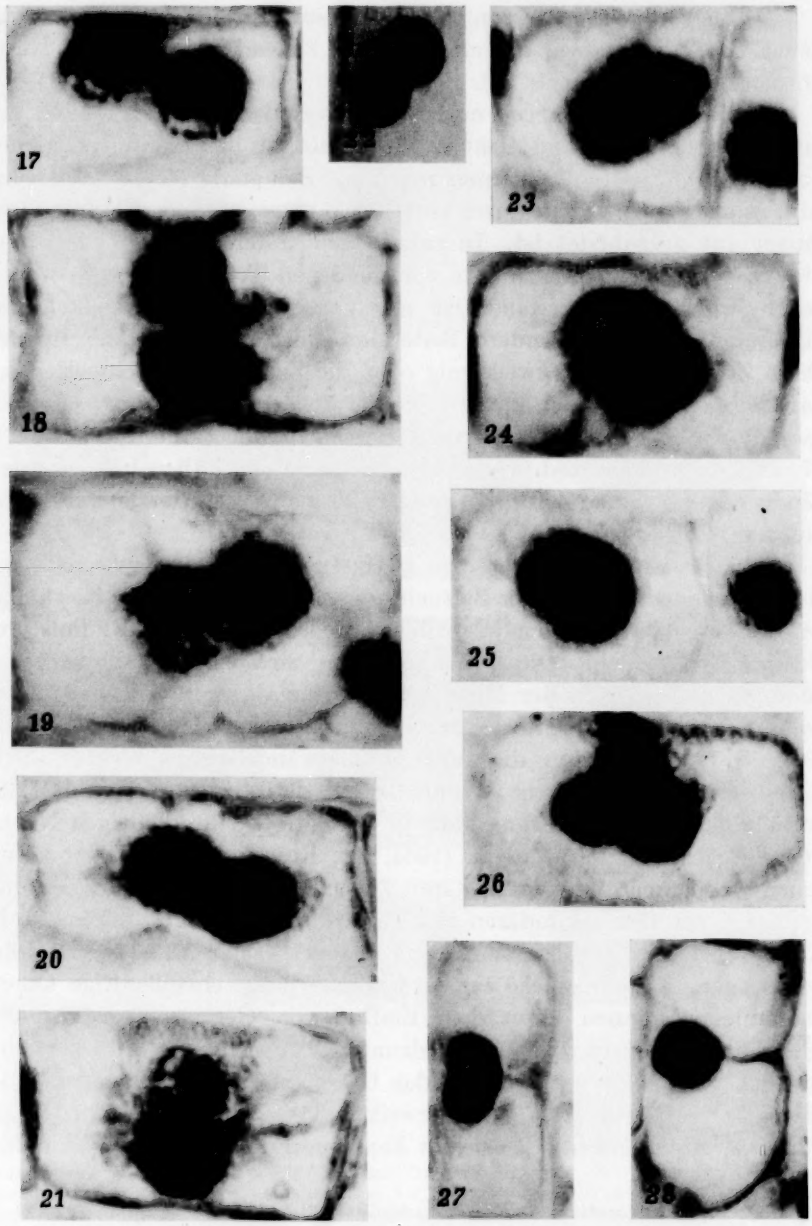



Abb. 17—24. Allmähliche Verschmelzungsstadien von pro- und interphasischen Zellkernen

Abb. 25. Polyploider Zellkern neben einem diploiden

Abb. 26. Dreikernige Zelle

Abb. 27 u. 28. Unvollständige bzw. vollkommene Kernverschmelzung. Zellwand nur teilweise gebildet

Schutzwirkung von Germanin auf die Zellkolloide in Zusammenhang bringen. Das Germanin stört augenscheinlich die Bildung der achromatischen Spindel. In anderen Fällen dagegen konnte es die Bildung der neuen Wand im Phragmoplasten stören oder selbst ganz verhindern (wie auch z. B. die Bildung der Befruchtungsmembran bei Seeigeleiern) und auch so zur Zweikernigkeit der Zelle führen. Die in unseren Präparaten gefundenen Strukturen können zugunsten dieser Vorstellung gedeutet werden: die Bildung der Querwände ist oft in verschiedenem Grade unvollkommen und kann dann die Verschmelzung der Zellkerne nicht hemmen. Eine solche Wirkung des Germanins soll aber nach JÍROVEC in saurer Lösung nicht stattfinden, es bringt hier im Gegenteil die Proteine selbst zur Koagulation. Im Gegensatz zu den Richtlinien der Fa. Bayer für den Gebrauch von Germaninlösungen, nach denen diese mit Lackmus neutral reagieren sollen, zeigten unsere Germaninlösungen in destilliertem Wasser einen $p_H$-Wert von 5,5. Wie diese Lösungen im Zellinnern reagieren, ist uns unbekannt.

*5. Chromosomenbrücken* in der Ana- und Telophase traten verhältnismäßig selten auf. Es waren aber gelegentlich auch doppelte Brücken zu sehen (Abb. 10, 12, 13), wobei die Verbindungsfäden sehr dünn und lang sein konnten und an ähnliche Strukturen bei Bestrahlung mit Radiumstrahlen erinnerten (MILOVIDOV 1929).

Nach der *Einwirkung von Germanin während 50 Std* wurden nur einzelne Teilungsfiguren, hauptsächlich Prophasen, gefunden. Gelegentlich blieben Mitosen ganz aus. Die Zellkerne zeigten Neigung zur Pyknose. Die Ruhekerne färbten sich nicht selten schwach. In den Zellen des Periblems traten reichlich Niederschläge auf, nicht aber in den Pleromzellen. Die degenerierenden Zellen an der Grenze von Periblem und Plerom enthielten Vacuolen und bizarre Niederschläge („Koazervate"). Nach *50stündiger Einwirkung des Germanins und nachfolgendem 24stündigem Wachstum* in feuchtem Sägemehl sieht man in allen Wurzelteilen ein normales Bild mit genügender Mitosenzahl in allen Teilungsphasen. Niederschläge wurden besonders in der Wurzelmitte gefunden, wo eine Reihe degenerierender, mit Niederschlägen erfüllter Zellen und Kerne zu bemerken waren. Im *Kontrollversuch (24 Std Wasser + 48 Std Sägespäne)* verliefen die Mitosen ungestört. Niederschläge sind hier selten.

Die erwähnten Mitoseabnormitäten wurden also in 3 Versuchsserien gefunden, und zwar in 20, 40 bzw. 80% der Objekte. Die Bewertung der Mitoseanomalien wurde dabei ganz allgemein, nur visuell, nicht statistisch durchgeführt. Die annähernde Totalzahl solcher Abweichungen betrug ungefähr 30—150 pro Würzelchen. Wir können die Mitwirkung von anderen Außenfaktoren, wie mögliche Temperatur- und Feuchtigkeitsschwankungen während des Versuches, mechanischen Druck usw. nicht ganz ausschließen. Jedoch wurden solche Teilungs-

abnormitäten im Kontrollversuch nie gefunden. Das Germanin mit seinem hohen Molekulargewicht (1448) dringt wahrscheinlich in das pflanzliche Gewebe sehr langsam ein. Bei Tieren kann dieser Vorgang schneller verlaufen, so daß für die antimitotische Wirkung hier schon viel niedrigere Konzentrationen genügen. So fand z. B. Jírovec bereits Effekte bei 0,01%. Die von ihm erwähnten mehrpoligen Figuren wurden von uns jedoch nicht beobachtet.

## Zusammenfassung

Germanin in 0,5%iger wäßriger Lösung bringt nach 6stündiger Einwirkung die Kernteilungen in den jungen Keimwurzeln von *Vicia faba* allmählich zum Stillstand; diese erscheinen aber nach 24stündigem Wachstum in feuchten Sägespänen von neuem. Ähnliches tritt auch nach 24stündiger Einwirkung von Germanin auf, wenn die Würzelchen nach dieser Behandlung 24 Std unter normalen Bedingungen verbleiben. In drei von diesen vier Versuchen wurden verschiedene Mitosestörungen wie Zweikernigkeit, Kernverschmelzungen in verschiedenen Teilungsstadien, Chromosomenbrücken, Polyploidie, abnormale Teilungsfiguren usw. gefunden. Nach 50stündiger Einwirkung werden die Mitosen beinahe oder ganz eingestellt, sie erscheinen aber nach 24stündiger Erholung von neuem. Im Kontrollversuch (24 Std Wasser + 48 Std Sägespäne) blieb das Aussehen der Würzelchen normal, es entwickelten sich auch normale mitotische Figuren. Am stärksten war der Effekt des Germanins nach 24stündiger Einwirkung und nachfolgendem 24stündigem Wachstum in Sägemehl.

Frau J. Burianová bin ich für ihre wertvolle technische Mitarbeit sehr zu Dank verpflichtet.

Herrn Kollegen Prof. Dr. O. Jírovec danke ich bestens für die liebenswürdige Überlassung von Germanin und für die Anregung, die Wirkung dieses Heilmittels auch an pflanzlichen Zellen zu prüfen.

## Literatur

Jírovec, O.: Über einige interessante physikalisch-chemische und biologische Eigenschaften von Germanin (Bayer 205). I. Biochem. Z. **314**, 265—276 (1943a); — II. Biochem. Z. **315**, 69—82 (1943b).

Jírovec, O., u. V. Kocián: Über die Schutzwirkung von Bayer 205 auf einige Eiweißstoffe. Biochem. Z. **220**, 27—40 (1930).

Milovidov, P.: L'influence des rayons beta et gamma du radium sur les chondriosomes de la cellule végétale. Bull. Internat. Acad. Sci. Bohême 1929, p. 1—12.

Němec, B.: Rostlinopis. II. Aventinum (Praha), 1—705 (1930).

Roelofsen, P.: The plant cell wall. In Linsbauers Handbuch der Pflanzenanatomie, 1959. 335 S.

Tripp, V., A. Moore and M. Rollins (zit. Roelofsen): Textile Res. J. **21**, 886 (1951). Siehe auch Ann. Chem. **24**, 1721 (1952).

Dr. P. Milovidov,
Praha 6, Ždanova 59 (Tschechoslowakei)

Planta 57, 463—477 (1961)

Aus dem Botanischen Institut der Justus Liebig-Universität zu Gießen

# ÜBER DIE NATÜRLICHEN INDOLVERBINDUNGEN IM BLUMENKOHL*

Von

FRANZ MÜLLER

Mit 1 Textabbildung

*(Eingegangen am 24. Juli 1961)*

## Einleitung

Bereits 1939 und 1940 hat LINSER erstmalig auf den ungewöhnlich hohen Gehalt verschiedener Kohlarten an Indolverbindungen hingewiesen. Durch die Anwendung modernerer Trennungsmethoden, besonders der Papierchromatographie und Papierelektrophorese, konnten im letzten Jahrzehnt genauere Angaben über die chemische Struktur einiger Indolderivate in den als Gemüse angebauten Züchtungsformen von *Brassica oleracea* gemacht werden. Hierbei sind vor allen Dingen Weißkohl, Sprossenkohl und Wirsingkohl untersucht worden (Literatur bei GORDON 1954; MELCHIOR 1958 und BENTLEY 1958).

Aus *Blumenkohl* (*Brassica oleracea* var. *botrytis L.*) haben WELLER, WITTWER und SELL (1954) die $\beta$-Indolylessigsäure (IES)[1] und zwei weitere Indolverbindungen isoliert. KEFFORD (1955) hat das Vorkommen der IES und eines Stoffes nachgewiesen, den er für das $\beta$-Indolylacetonitril (IAN) oder die $\beta$-Indolylbrenztraubensäure (IBTS) hielt. Von LINSER, KIERMAYER und YOUSSEF (1958) und LINSER, YOUSSEF und KIERMAYER (1958) ist neben kleineren Mengen von IES das IAN gefunden worden; die gleichen Autoren haben auch das Vorkommen der $\beta$-Indolylcarboxylsäure (ICS) und der IBTS als wahrscheinlich angenommen.

Die chlorophyllfreien, gestauchten Blütenstandsanlagen — die Blumenkohlrosen — stellen ein sehr geeignetes homogenes Gewebematerial für Versuche über den enzymatischen Abbau von synthetischen Indolverbindungen dar (2. Teil dieser Veröffentlichung). Eine genauere Untersuchung der *nativen Indolverbindungen des Blumenkohls* erscheint daher wünschenswert. Sie ist nämlich eine wichtige Voraussetzung für den späteren Vergleich der nativen Indolverbindungen mit den Produkten, die nach Infiltration von synthetischen Indolderivaten im Gewebe entstehen.

* Erster Teil einer Dissertation der Naturwissenschaftlich-Philosophischen Fakultät der Justus Liebig-Universität, Gießen.

[1] Die Abkürzungen der Indolverbindungen sind auf S. 467 und in Tabelle 1 zusammengestellt.

Darüber hinaus sollte durch die quantitative Bestimmung einzelner Indolverbindungen festgestellt werden, wie sich ihre Menge im Gewebe während der Entwicklung der Pflanzen ändert.

Hierfür war es notwendig, die Extraktions-, Identifikations- und quantitativen Bestimmungsmethoden so auszuwählen, daß sie direkte stoffliche Aussagen über die einzelnen Indolderivate gestatten. Weiter sollten sie für die Reihenuntersuchungen des 2. Teils der Veröffentlichung geeignet sein. Auf biologische Tests, bei denen bekanntlich nur indirekt über die Wuchsstoffwirksamkeit auf das Vorliegen bestimmter Mengen an Indolverbindungen geschlossen werden kann, wurde aus den erwähnten Gründen verzichtet.

## I. Material und Methode

### *1. Pflanzenmaterial*

Alle Versuche wurden mit der Blumenkohlsorte „Erfurter Zwerg" durchgeführt. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus herangezogen.

### *2. Extraktionsmethoden*

Bei der Extraktion müssen alle natürlich vorkommenden Indolverbindungen aus dem Gewebe herausgelöst werden, ohne daß sie sich verändern. Eine gute Auftrennung mittels der Papierchromatographie und der Papierelektrophorese kann nur dann erreicht werden, wenn die Extrakte wenig Begleitstoffe enthalten. Aus diesem Grunde wurden nach einigen Vorversuchen Wasser und Alkohol als Extraktionsmittel ausgeschieden. Auch das Kochen des Gewebes bei der Extraktion schien mir wegen der eventuell entstehenden Umwandlungsprodukte nicht ratsam. Ebenso kam eine Reinigung der Extrakte durch Ausfällen der Begleitstoffe nicht in Frage, da hierbei die Indolverbindungen an den voluminösen Niederschlägen adsorbiert werden können.

**a) Extraktion von frischem Material mit Äthyläther.** Das in kleine Stücke geschnittene Pflanzenmaterial wurde mit der vierfachen Menge Äthyläther 20 Std im Kühlschrank (2—4° C) extrahiert. Danach wurde der Äther abgegossen und unter leichter Erwärmung und vermindertem Druck zur Trockene eingeengt. Der trockene Rückstand wurde darauf mit wenig Äthanol aufgenommen.

**b) Ätherextraktion von gefriergetrocknetem Pflanzenmaterial.** Das sauber gewaschene Pflanzenmaterial wurde zerkleinert und im Gefriertrockner unter Vakuum getrocknet (50 g Frischmaterial in 20—25 Std). Das trockene Material wurde anschließend im Kühlschrank 20 Std mit Äthyläther extrahiert. Die Weiterbehandlung des Extraktes erfolgte wie bei der Extraktion von Frischmaterial (Extraktion a).

**c) Ätherextraktion von gefriergetrocknetem Pflanzenmaterial mit anschließender fraktionierter Ausschüttelung.** Das gefriergetrocknete Gewebe wurde fein zerrieben und mit Aqua dest. versetzt. Nach kräftigem Schütteln wurde es mit konz. $NaHCO_3$ auf $p_H = 8$ gebracht und dreimal 10 min lang mit je 100 ml Äther ausgeschüttelt. Nach Ansäuern mit konz. HCl auf $p_H = 3$ wurde abermals dreimal mit Äther ausgeschüttelt. Die beiden Ätherphasen wurden zur Trockene eingeengt und wie bei der Extraktion a die Rückstände mit wenig Äthanol aufgenommen.

**d) Fraktionierte Ätherausschüttelung von Preßsaft.** Das gewaschene Pflanzenmaterial wurde unter Zusatz einer geringen Menge von festem $NaHCO_3$ in einem Homogenisator gründlich zerkleinert. Aus dem homogenen Gewebebrei wurde

darauf durch Auspressen in einem Leinentuch der Rohpreßsaft gewonnen. Erfahrungsgemäß ist das Ausschütteln dieses Preßsaftes sehr schwierig, da sich die Wasser- und die Ätherphasen nicht voneinander trennen, sondern ein gallertiges Gemisch ergeben. Deshalb wurde der Rohpreßsaft vor dem Ausschütteln ultrafiltriert, um auf diese Weise die hochmolekularen Stoffe abzutrennen (vgl. SPARMANN und SCHNEIDER 1955). Ich verwendete dazu ein Druckfiltriergerät der Membranfiltergesellschaft Göttingen mit Ultrafeinfiltern (Porendurchmesser 10 bis 20 mμ). Der Stickstoffdruck betrug 25—30 atm. Durch intensives Schütteln der ganzen Filtrieranlage ließ sich für 35 ml Extrakt die Filtrationszeit von 7 auf 2 Std herabsetzen. Der filtrierte Preßsaft wurde darauf, wie bei der Extraktionsmethode c angegeben, sauer und basisch ausgeschüttelt.

Die Extrakte wurden in der Regel sofort chromatographisch weiterverarbeitet; falls das ausnahmsweise nicht möglich war, wurden sie bis zur Verarbeitung bei $+2^0$ C im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3. *Papierchromatographie*

Nach einigen Vorversuchen erwies sich die aufsteigende, eindimensionale Methode (v. DENFFER, BEHRENS, FISCHER 1952) für meine Zwecke am geeignetsten. Die dabei erhaltenen Chromatogramme sind außerdem für die quantitative Auswertung sehr gut zu verwenden. Als Chromatographierpapier benutzte ich ausschließlich die handelsübliche Sorte S & S Nr. 2043b Mgl. Die Streifen waren in der Laufrichtung der Bogen 30 cm lang und 4 bzw. 8 cm breit. Die Extrakte wurden mit einer Mikropipette (Blutzuckerpipette) 4 cm vom unteren Rand als Strich über die ganze Streifenbreite aufgetragen. Die Chromatographie wurde bei schwachem Licht in Glasaquarien ($20 \times 20 \times 33$ cm) durchgeführt, in denen das Lösungsmittel Isopropanol/Ammoniak/Wasser bei einer Temperatur von $20^0$ C in 10 bis 12 Std etwa 28 cm hoch stieg. Die Streifen wurden darauf an der Luft getrocknet und mit den Nachweisreagentien besprüht.

**a) Lösungsmittel (Steigflüssigkeiten).** Als Lösungsmittel wurden für die Auftrennung meiner Extrakte Isopropanol/Ammoniak 25%ig/Wasser (80:5:15), n-Butanol/Eisessig/Wasser (80:5:15) und Aqua dest. verwendet. Am günstigsten war die Verwendung von Isopropanol/Ammoniak/Wasser; die Angaben von $R_f$-Werten beziehen sich daher stets auf dieses Lösungsmittel.

**b) Nachweisreagentien (Sprühreagentien).** Für die Identifizierung der Indolverbindungen auf den Chromatogrammen sind außer den $R_f$-Werten die Färbungen der Reaktionsprodukte mit verschiedenen Sprühreagentien wichtig. Daher wurden alle mir zur Verfügung stehenden Indolverbindungen chromatographiert und mit verschiedenen Nachweisreagentien behandelt. Die Farben der Indolderivate mit den fünf geeignetsten Sprühreagentien sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

**c) Zusammensetzung der Nachweisreagentien.** *Perchlorsäure-Reagens (Salkowski-Reagens).* 175 ml Aqua dest., 25 ml Perchlorsäure (35%ig) und 0,4 ml 0,5 mol. $FeCl_3$-Lösung. Trocknungszeit: 30 min bei $50^0$ C.

*p-Dimethylaminobenzaldehyd-Reagens.* 2 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 80 ml 95%igem Äthanol und 20 ml 6 n-HCl gelöst. Trocknungszeit: 30 min bei $50^0$ C (ARMSTRONG et al. 1958).

*Vanillin-Reagens.* 1%ige Lösung von Vanillin in HCl (1,16). Trocknungszeit: 15 min bei $50^0$ C.

*Zimtaldehyd-Reagens.* 5 ml Zimtaldehyd in 95 ml 96%igem Äthanol und 5 ml konz. HCl gelöst. Trocknungszeit: 30 min bei $50^0$ C (SEN u. LEOPOLD 1954; SEN 1959).

Tabelle 1. *Farbreaktionen synthetischer Indolverbindungen mit verschiedenen Sprühreagentien*

In der Spalte „Menge in $\mu$g" sind die $\mu$g-Mengen, die auf den Chromatogrammen (Streifenbreite 4 cm) noch eindeutig gefärbte Zonen ergeben, angeführt.

| Substanz (Abkürzung in Klammer) | Nachweisreagentien | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Perchlorsäure-Reagens | | Dimethyl-aminobenzaldehyd | | Vanillin | | Zimtaldehyd | | $NaNO_2$-HCl | | Weitere Reagentien | |
| | Farbe | Menge in $\mu$g | Farbe | Menge in $\mu$g | Farbe | Menge in $\mu$g | Farbe | Menge in $\mu$g | Farbe | Menge in $\mu$g | Reagens[2] | Farbe |
| $\beta$-Indolylcarboxylsäure (ICS) | orange | 1 | violett | 1 | rosa | 1 | gelborange | 3 | hellila | 1 | Xanth. | sofort blauviolett |
| $\beta$-Indolylessigsäure (IES) | rosa | 1 | blauviolett | 1 | blauviolett | 1 | gelbbraun | 1 | rosa | 3 | NN | rosa |
| IES-Kaliumsalz | rosa | 1 | blauviolett | 1 | violett | 1 | hellbraun | 1 | purpur | 3 | | |
| IES-Äthylester | violett | 1 | violett | 1 | blauviolett | 3 | | | | | | |
| $\beta$-Indolylpropionsäure (IPS) | lila | 1 | violettblau | 1 | violettblau | 1 | braun | 1 | orangegelb | 3 | NN | hellbraun |
| $\beta$-Indolylbuttersäure (IBS) | violett | 1 | violett | 1 | violett | 1 | braun | 1 | grünlich-gelb | 3 | NN | gelbbraun |
| IBS-Kaliumsalz | violett | 1 | violett | 1 | violett | 1 | braun | 1 | braungelb | 3 | | |
| $\beta$-Indolylmilchsäure | orange | | violett | | violett | 1 | gelboliv | 1 | hellorange | 3 | | |
| $\beta$-Indolylbrenztrauben-säure (IBTS)[1] | braunviolett | | olivgrün | | gelbbraun | | gelb | | orange | | am. $AgNO_3$ | sofortige Reduktion |
| $\beta$-Indolylacrylsäure | gelborange | 1 | blaugrün | 1 | gelborange | 1 | rosaorange | 1 | | | NN | rotbraun |
| $\beta$-Indolylacetamid (IAM) | schmutzig-rosa | 3 | blauviolett | 3 | gelb | | gelboliv | 3 | orangegelb | | | |
| $\beta$-Indolylacetonitril (IAN) | blaugrün | 1 | violett | 1 | gelb | 5 | gelb | 3 | orangegelb | 3 | | |
| $\beta$-Indolylaldehyd (IA) | orange | 6 | hochrot | 5 | purpur | 6 | gelborange | 5 | hochrot | 5 | Benzidin | gelb 0,5 $\mu$g |
| | | | | | | | | | | | DNPH | braun 0,6 $\mu$g |
| Tryptamin-Base (Tri) | violett | 1 | violett | 1 | violett | 1 | braunrosa | 3 | gelb | 5 | Ninhydrin | braunviolett |
| Tryptophol (Tro) | braunviolett | 1 | lila | 1 | violett | 1 | gelb | 1 | gelb | 3 | Xanth. | blau, Rand violett |
| d,l-Tryptophan (Tra) | grauviolett | 1 | lila | 1 | blauviolett | 1 | gelbbraun | 3 | gelb | 1 | Ninhydrin | hellviolett |
| Indol | orangerosa | 1 | lila | 1 | rosa | 1 | gelborange | 3 | hochrot | 1 | Xanth. | sofort blauviolett |
| Skatol | braunorange | 1 | violettblau | 1 | violett | 1 | orangegelb | 3 | gelb | 1 | Xanth. | keine sofortige Färbung |
| 2-Methylindol | hochrot | 1 | violett | 1 | gelborange | 1 | orangegelb | 3 | hellbraun | 3 | | |
| Oxindol | | | gelb | 3 | gelb | | gelb | 1 | gelb | | NaNPA | olivbraun |
| Gramin | lila | | gelb | 3 | | | | | gelborange | | $NH_4VO_3$ | weiß[3] |
| | | | | | | | | | | | NaNPA | blaugrün |
| | | | | | | | | | | | NN | grün mit violettem Rand |
| $\beta$-Indolylacetat | graublau | | gelborange | 1 | rosa | | gelborange | 3 | hellbraun | 3 | | |
| Kynurensäure | — | | — | | — | | — | | — | | | |
| d,l-Kynurenin | hellbraun | | orangegelb | | hellgelb | | hellgelb | | — | | | |
| Anthranilsäure | | | gelborange | | gelb | | gelb | | | | | |
| 3-Hydroxy-Anthranilsäure | hellbraun | | rosa | | gelb | | hellgelb | 3 | gelb | | | |

[1] Die IBTS ist nicht chromatographiert worden. [2] Die Abkürzungen der Sprühreagentien sind auf S. 467 und 468 erklärt.
[3] Vergleiche Fußnote auf S. 467.

*$NaNO_2$-HCl-Reagens.* Frisch bereitete Lösung von 1 g $NaNO_2$ in 100 ml n-HCl. Trocknungszeit: 10 min bei 100° C.

*Xanthydrol-Reagens (Xanth.).* 10 ml einer 10%igen methanolischen Xanthydrol-Lösung in 10 ml Eisessig. Trocknungszeit: 15 min bei 50° C oder Auswertung gleich nach dem Sprühen (Indol und β-Indolylcarboxylsäure!). (UDENFRIEND 1955; abgeändert.)

*α-Nitroso-β-Naphthol-Reagens (NN).* Die Chromatogramme wurden zunächst mit einer 0,01%igen äthanolischen Lösung von α-Nitroso-β-Naphthol und anschließend mit 10%iger $HNO_3$ besprüht. Trocknungszeit: 15 min bei 90° C.

*Benzidin-Reagens (van Ecks-Reagens).* 5 g Benzidin in 100 ml Eisessig. Trocknung an der Luft bei Zimmertemperatur (SEN u. LEOPOLD 1954).

*2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens (DNPH).* 0,4%ige Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2n-HCl. Trocknung an der Luft bei Zimmertemperatur.

*Ninhydrin-Reagens.* 0,2%ige Lösung in 96%igem Äthanol. Trocknungszeit: 10 min bei 100° C in einem mit Wasserdampf gesättigten Thermostaten.

*Natrium-Nitroprussid/Acetaldehyd (NaNPA).* 5 g Natrium-Nitroprussid in 100 ml 10%igem wäßrigen Acetaldehyd. Unmittelbar vor dem Verwenden 2 g $Na_2CO_3$ zusetzen. Trocknungszeit: 10 min bei 100° C (HAIS u. MACEK 1958).

*Ammoniumvanadat-Reagens ($NH_4VO_3$)*[1]. Gesättigte Lösung von Ammoniumvanadat in Aqua dest. Trocknungszeit: 10 min bei 50° C.

*Ammoniakalische Silbernitrat-Lösung (am. $AgNO_3$).* 50 ml Ammoniak-Lösung (konz.) und 100 ml n-$AgNO_3$ (BENTLEY et al. 1956).

Außer $NaNO_2$-HCl, das immer frisch angesetzt wurde, sind die Reagentien im Kühlschrank mindestens 14 Tage haltbar. Zur Herstellung der Nachweisreagentien wurden nur p.A.-Substanzen verwendet.

Die Streifen wurden gleichmäßig mit dem jeweiligen Sprühreagens besprüht (Stickstoff als Druckquelle) und in einem vorher auf die Entwicklungstemperatur eingestellten Wärmeschrank getrocknet. Genaues Einhalten der Trocknungstemperatur und Trocknungszeit sind Voraussetzung für die spätere Auswertung der Chromatogramme.

### *4. Papierelektrophorese*

Zur schnellen Auftrennung von Extrakten und zur Identifizierung von Indolverbindungen wurde auch das Verfahren der Papier-Hochspannungselektrophorese herangezogen (SCHNEIDER und SPARMANN 1955). Meine Apparatur glich im wesentlichen der von MELCHIOR (1957). Die Laufweiten der einzelnen Indolverbindungen entsprachen auch den von ihm angegebenen Werten. Die günstigste Trennung ergab die Verwendung von Essigsäure/Natriumacetat-Puffer nach WALPOLE ($p_H = 5{,}3$) oder 1/10 n-NaOH / 1/10 mol. Dinatriumcitrat-Puffer nach SÖRENSEN ($p_H = 5{,}8$) in einer Verdünnung von 1:96. Bei 3000 V betrug der Stromfluß 2,5—3 mA pro Streifen.

### *5. Herkunft und Abkürzungen der verwendeten Indolverbindungen*

Chemisches Institut der Justus Liebig-Universität, Gießen: β-Indolylcarboxylsäure = β-Indolylcarbonsäure (ICS), β-Indolylessigsäure (IES), β-Indolylbrenztraubensäure (IBTS), β-Indolylacetonitril (IAN), β-Indolylacetamid (IAM), Tryptamin-Base (Tri), Tryptophol, Oxindol.

[1] Mit diesem Reagens gab von den untersuchten Indolverbindungen nur Gramin eine Reaktion (weiße Zone auf gelbem bis gelbgrünem Papiergrund des Chromatogramms).

Firma E. Merck, Darmstadt: β-Indolylessigsäure (IES), β-Indolylbuttersäure (IBS), d,l-Tryptophan (Tra), Indol, Anthranilsäure.

Firma Dr. Th. Schuchardt, München: Kaliumsalze der β-Indolylessigsäure und der β-Indolylbuttersäure, β-Indolylpropionsäure (IPS), Gramin, Kynurensäure, Skatol.

Firma Fluka AG., Buchs SG.: β-Indolylessigsäure-Äthylester, β-Indolylmilchsäure, β-Indolylacetonitril (IAN), β-Indolylaldehyd = β-Indolylcarboxylaldehyd (IA), β-Indolylacetat.

Firma C. Roth, Karlsruhe: Tryptamin-HCl (Tri.).

Firma Hoffmann-La Roche, Grenzach: d,l-Kynurenin, 3-Hydroxyanthranilsäure.

Firma E. Crasselt, Kiel: β-Indolylacrylsäure, 2-Methylindol.

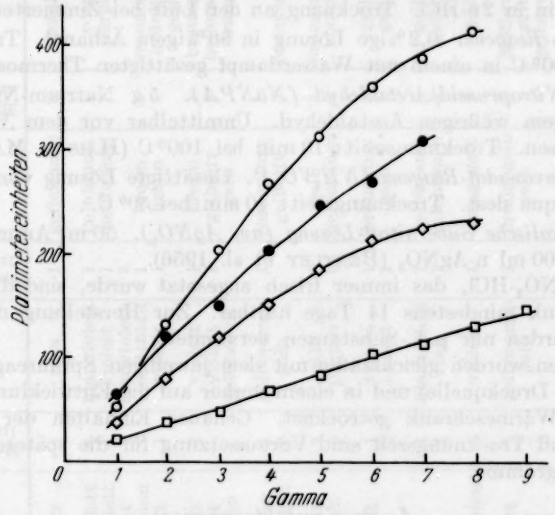



Abb. 1. Eichkurven zur quantitativen Bestimmung der β-Indolylcarboxylsäure (ICS) —◇—◇—; der β-Indolylessigsäure (IES) —○—○—; der β-Indolylpropionsäure (IPS) —●—●— und des β-Indolylacetamids (IAM) —□—□—. Die μg-Angaben beziehen sich auf eine Chromatogrammbreite von 4 cm

### *6. Durchführung der quantitativen Bestimmungen*

Die Chromatogramme wurden nach dem Sprühen mit Perchlorsäure-Reagens und Trocknen mit dem Extinktionsschreiber II von Zeiß (Grünfilter FE 63) ausgewertet[1]. Die erhaltenen Kurven wurden planimetriert und über Eichkurven (Abb. 1) die Gamma-Mengen bestimmt. Diese Mengen wurden auf 100 g Frischgewicht berechnet. (Mittlerer Fehler der Methode etwa 10%.) Bei den in Tabelle 3 angegebenen Werten handelte es sich um Mittelwerte aus mindestens 3 Versuchen.

## II. Ergebnisse

### *1. Qualitativer Nachweis von Indolverbindungen in Blumenkohlrosen*

Die bei der Extraktion von Blumenkohlrosen mit verschiedenen Extraktionsmethoden erhaltenen Zonen sind in Tabelle 2 zusammen-

[1] Das Gerät war durch Austausch des Graukeils speziell für die Auswertung von schwach gefärbten Zonen umgebaut worden.

gestellt. Als ungünstigste Extraktionsmethode erwies sich die Ätherextraktion von frischem Gewebematerial, bei der die in geringeren Konzentrationen vorliegenden Stoffe und die IES nicht erfaßt wurden. Bei allen anderen Methoden wurden stets nahezu die gleichen Zonen gefunden; daraus darf wohl geschlossen werden, daß es sich hierbei tatsächlich um native Indolverbindungen handelt.

**a) Indolderivate der sauren Ätherfraktion.** *Tryptophan (Tra).* Beim $R_f$-Wert 0,25 trat eine im Mischchromatogramm identifizierte schwache Tra-Zone auf; mit Ninhydrin ergab sie eine helle Violettfärbung[1].

*β-Indolylcarboxylsäure (ICS).* Bei allen vier Extraktionsmethoden lag beim $R_f$-Wert 0,3 eine mit Perchlorsäure-Reagens orange, mit Dimethylaminobenzaldehyd-Reagens violett und mit Vanillin-Reagens rosa gefärbte Zone vor. Besonders charakteristisch ist für sie die sofortige rosa bis blauviolette Farbe nach dem Besprühen mit Xanthydrol-Reagens. Diese Reaktion tritt bei den von mir untersuchten Indolverbindungen nur bei der ICS und dem Indol auf.

Tabelle 2. *Vergleich der bei der Extraktion mit vier verschiedenen Methoden aus Blumenkohlrosen erhaltenen nativen Indolverbindungen* (Lösungsmittel: Isopropanol/Ammoniak/Wasser; Sprühreagens: Perchlorsäure-Reagens).

| Ätherextraktion von frischem Material | | Ätherextraktion von gefriergetrocknetem Material | | Fraktionierte Ätherausschüttelung von gefriergetrocknetem Material | | | | Fraktionierte Ätherausschüttelung von Preßsaft | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | saure Fraktion | | basische Fraktion | | saure Fraktion | | basische Fraktion | |
| $R_f$-Wert | Farbe bzw. Stoff | $R_f$-Wert | Farbe bzw. Stoff | $R_f$-Wert | Farbe bzw. Stoff | $R_f$-Wert | Farbe bzw. Stoff | $R_f$-Wert | Farbe bzw. Stoff | $R_f$-Wert | Farbe bzw. Stoff |
| | | 0,1 | schwach rötlich | 0,09 | schwach rötlich | | | 0,13 | schwach rötlich | | |
| | | 0,18 | blaugrün | 0,16 | blaugrün | | | 0,15 | grünlich | | |
| | | 0,25 | Tra | 0,25 | Tra | | | 0,25 | Tra | | |
| 0,3 | ICS | 0,3 | ICS | 0,3 | ICS | | | 0,3 | ICS | | |
| | | 0,45 | IES | 0,45 | IES | | | 0,45 | IES | | |
| 0,5 | IPS | 0,5 | IPS | 0,5 | IPS | | | 0,5 | IPS | | |
| | | 0,6 | rosa | 0,6 | rosa | | | 0,6 | rosa | | |
| | | 0,7 | rötlich | | | 0,7 | rosa | | | 0,7 | rosa |
| 0,75 | rötlich | 0,83 | rötlich | | | 0,83 | rötlich | | | 0,83 | rötlich |
| | | 0,85 | IA | | | 0,85 | IA | | | 0,85 | IA |
| 0,83 | IA | 0,9—0,92 | IAN | | | 0,9 | IAN | | | 0,9—0,92 | IAN |
| 0,9 | IAN | 0,93 | rötlichbraun | | | 0,93—1 | rötlich | | | 0,93 | rötlichbraun |
| 0,95—1 | rötlich | 0,95—1 | rötlich | | | | | | | 0,95—1 | orangerosa |

[1] Mit Ninhydrin konnten außerdem in der sauren Fraktion mindestens fünf violett gefärbte Zonen nachgewiesen werden.

Außerdem haben die Zone 0,3 und synthetische ICS in verschiedenen Lösungsmitteln den gleichen $R_f$-Wert.

*β-Indolylessigsäure (IES).* Bei der Ätherextraktion von Frischmaterial konnte ich keine IES feststellen, während bei den drei anderen Extraktionen beim $R_f$-Wert 0,45 eine deutliche IES-Zone auftrat. (Beweis der Identität mit synthetischer IES durch Mischchromatogramme, gleiche Laufweiten bei der Papierelektrophorese und übereinstimmende Farben mit verschiedenen Sprühreagentien.)

*β-Indolylpropionsäure (IPS).* In allen Chromatogrammen trat beim $R_f$-Wert 0,5 eine Zone auf, die sich wie die IPS verhielt (Mischchromatogramme, verschiedene Sprühreagentien).

*Unidentifizierte Zonen.* Beim *$R_f$-Wert 0,09—0,13* lag eine mit Perchlorsäure-Reagens schwach rötlich gefärbte Zone vor. Beim *$R_f$-Wert 0,15—0,18* kam eine grünlichblau färbbare Zone vor, bei der noch nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob es sich bei diesem Stoff überhaupt um eine Indolverbindung handelt. Weiter trat beim *$R_f$-Wert 0,6* eine rosa Färbung auf.

**b) Indolderivate der basischen Ätherfraktion.** *β-Indolylaldehyd (IA).* Durch die Färbungen mit Benzidin-Reagens (gelb) und 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens (braun) konnte beim $R_f$-Wert 0,85 der IA eindeutig nachgewiesen werden.

*β-Indolylacetonitril (IAN).* Dieser beim $R_f$-Wert 0,9—0,92 vorliegende Stoff deckt sich in allen durchgeführten Identifizierungs-Reaktionen mit synthetischem IAN.

*Unidentifizierte Zonen.* Beim $R_f$-Wert *0,7* lag eine mit Perchlorsäure-Reagens rosa gefärbte Zone vor. Die Zone beim *$R_f$-Wert 0,83* war mit Perchlorsäure-Reagens rötlich färbbar. Eine Übereinstimmung mit synthetischem IAM ergab sich nicht. Die rötlichbraune Zone beim *$R_f$-Wert 0,93* wurde mit der Zone „W ?" von MELCHIOR (1958) verglichen, es konnte jedoch keine Identität festgestellt werden. Im *$R_f$-Bereich 0,95—1* dürfte die Färbung auf verschiedene Stoffe zurückzuführen sein. Auch Verunreinigungen aus dem Extrakt, die an die Lösungsfront laufen, könnten dabei eine Rolle spielen. Beim Vergleich mit synthetischem Skatol und Indol konnte aus diesen Gründen keine eindeutige Identität mit bestimmten Zonen festgestellt werden. Auch Versuche mit Steigflüssigkeiten zur Trennung von basischen Indolverbindungen (NITSCH u. NITSCH 1955) führten zu keiner klaren Auftrennung dieser Zonen.

### *2. Nachweis von Indolverbindungen in Blumenkohlblättern*

In den Blättern konnten im wesentlichen die gleichen Indolverbindungen wie in den Blumenkohlrosen papierchromatographisch nach-

gewiesen werden. Einzelne Stoffe traten allerdings in sehr geringen Konzentrationen auf. So war die rötliche Färbung (Perchlorsäure-Reagens) im $R_f$-Bereich 0,09—0,13 der sauren Fraktion und 0,7 der basischen Fraktion nur sehr undeutlich. Außerdem war der Gehalt an Störsubstanzen in der basischen Fraktion beim $R_f$-Wert 0,95—1 sehr groß.

### *3. Bestimmung des Gehaltes an β-Indolylmonocarbonsäuren und des β-Indolylacetonitrils in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Blumenkohlpflanzen*

Nach der qualitativen Bestimmung der im Blumenkohl natürlich vorkommenden Indolverbindungen wurde untersucht, wie sich der Gehalt einiger Indolverbindungen während der Entwicklung der Blumenkohlpflanzen ändert. Es wurden dabei nur die drei ersten einbasischen β-Indolylfettsäuren (ICS, IES, IPS) ausgewertet und für das IAN die vorliegenden Mengen durch Angaben in Planimetereinheiten ausgedrückt. Die Gesamtmenge der Indolverbindungen ist sicher größer als die Summe der in Tabelle 3 angegebenen Werte, da einerseits in der sauren Fraktion

Tabelle 3. *Vergleich des Gehaltes an β-Indolylcarboxylsäure (ICS), β-Indolylessigsäure (IES), β-Indolylpropionsäure (IPS) und an β-Indolylacetonitril (IAN) in verschiedenen Pflanzenteilen und Entwicklungsstadien des Blumenkohls*

(Extrakt aus jeweils 100 g Frischmaterial.) Für die ICS, IES und IPS erfolgte die Mengenangabe in μg; die IAN-Mengen sind in Planimetereinheiten (PlE) angegeben.

| Entwicklungsstadium | ICS | IES | IPS | IAN |
|---|---|---|---|---|
| 1. Keimpflanzen (Alter 12 Tage) . . . . . | 14,0 | 7,0 | 5,5 | 1334 |
| 2. Blätter junger Pflanzen (Alter 60 Tage). | 20,7 | 7,1 | 8,4 | 1461 |
| 3. Ausgewachsene Blätter von Pflanzen vor der Bildung von Rosen . . . . . | 18,5 | 15,7 | 12,6 | 1687 |
| 4. Ausgewachsene Blätter von Pflanzen mit Rosen . . . . . | 23.1 | 17,3 | 14,0 | 1189 |
| 5. Blumenkohlrosen . . . . . | 112,5 | 22,1 | 42,0 | 2186 |
| 6. Blütensprosse und Blüten. . . . . | 23,0 | 15,5 | 19,2 | 1800 |
| 7. Unreife Früchte . . . . . | 29,6 | 20,3 | 11,4 | |

noch weitere Indolverbindungen vorkommen und da andererseits die basische Fraktion neben unidentifizierten Stoffen noch erhebliche Mengen an IA enthält. Das IA färbt sich aber mit Perchlorsäure-Reagens nicht, und das gelb gefärbte Reaktionsprodukt mit Benzidin ist — wie in Vorversuchen festgestellt worden war — mit dem Extraktionsschreiber nicht auswertbar. Auch das IAN bereitet bei der Auswertung Schwierigkeiten; einmal wegen der benachbarten basischen Zonen, zum anderen wegen der Veränderlichkeit des bläulichgrün bis gelblichgrün gefärbten

Reaktionsproduktes mit Perchlorsäure-Reagens. Aus diesem Grunde mußte auf eine Aufstellung einer Eichkurve für das IAN verzichtet werden.

Der ICS-Gehalt der Blätter (Stadium 1—4) nimmt während der Ontogenie leicht zu; in den Blütensprossen und Blüten (Stadium 6) entspricht er ungefähr dem der Blätter im Stadium 4; in den unreifen Früchten dagegen steigt er weiter an. Der ICS-Gehalt von Blumenkohlrosen ist fast fünfmal höher als in den vergleichbaren Pflanzenteilen.

Auch der IES-Gehalt steigt während der Entwicklung der Blätter an. Wiederum ist die Menge bei den Rosen am höchsten; sie liegt aber nur knapp über derjenigen der übrigen Pflanzenteile.

Für die IPS ist eine ähnliche Mengenzunahme wie für die ICS festzustellen. Die IPS-Menge in den Rosen ist etwa dreimal größer als in ausgewachsenen Blättern.

Wie schon gesagt konnten für den IAN-Gehalt keine absoluten Zahlen angegeben werden. Der visuelle Vergleich der Chromatogramme und ihre Auswertung in Planimetereinheiten zeigte jedoch bei der Entwicklung der Blätter (Stadium 1—3) eine leichte Zunahme des IAN-Gehaltes. Ausgewachsene Blätter des Stadiums 4 haben einen geringeren IAN-Gehalt als jüngere Blätter. Blumenkohlrosen enthielten auch hier die größten Mengen an IAN.

## III. Besprechung der Ergebnisse

Im Gewebe von Blumenkohl konnten die ICS, die IES, die IPS, das IAN, der IA, das Tra und einige unbekannte Stoffe mit Indolreaktionen festgestellt werden. Der eindeutige Nachweis der ICS (von LINSER, YOUSSEF und KIERMAYER 1958, in Blumenkohl vermutet) und des IA (von v. DENFFER, BEHRENS und FISCHER 1952; FISCHER 1954; JONES und TAYLOR 1957, und MELCHIOR 1958, in Weißkohl gefunden) deutet darauf hin, daß der enzymatische Abbau der nativen IES den Weg über diese Stoffe nimmt (vgl. hierzu MELCHIOR 1958). Weitere Hinweise für die Annahme bringen die Ergebnisse des 2. Teiles dieser Veröffentlichung. Der eindeutige Nachweis der IES im Blumenkohl gelang erst nach Aufschluß des Gewebes durch Gefriertrocknen oder Homogenisieren (Extraktionsmethoden b—d). Das Fehlen der IES in Extrakten nach 20stündiger Ätherextraktion von Frischmaterial deutet darauf hin, daß die IES nicht in freier, sondern in gebundener Form vorliegt (vgl. THIMANN u. SKOOG 1937; VAN OVERBEEK et al. 1945, 1947; WILDMAN und MUIR 1949; BONDE 1953; LARSEN 1955; SIEGEL u. GALSTON 1953; MELCHIOR 1958). Mit dem Auftreten der IPS im Blumenkohl konnte für diese Säure der Nachweis in einer weiteren Gemüseform

von *Brassica oleracea* erbracht werden. Linser, Mayr und Maschek (1954) haben die IPS im Sprossenkohl vermutet, und Melchior (1958) hat die IPS im Weißkohl nachgewiesen. Das Vorkommen der IPS in weiteren *Brassica*-Gemüsen ist durchaus denkbar.

Mit verschiedenen Extraktionsmethoden ließen sich im wesentlichen die gleichen Indolderivate aus dem Gewebe extrahieren. Diese Tatsache berechtigt zu der Annahme, daß es sich bei den extrahierten Stoffen um native Indolverbindungen handelt und nicht um Artefakte, die während der Extraktion entstanden sind. Die Mengen der nachgewiesenen Stoffe (ICS, IES, IPS) wurden in $\mu$g angegeben.

Bei allen derartigen Absolutangaben ist zu berücksichtigen, daß die nach Extraktion und papierchromatographischer Trennung der Indolverbindungen gewonnenen Werte sicher unter den tatsächlich im Gewebe vorhandenen Mengen liegen. Auf die bei der Extraktion auftretenden Verluste haben bereits Linser (1951), Linser, Mayr, Maschek (1954) und Fischer (1954) aufmerksam gemacht; daß auch bei der Reinigung und Fraktionierung der Extrakte Verluste auftreten, ist sehr wahrscheinlich. So konnte z. B. festgestellt werden, daß beim Chromatographieren von Rohpreßsaft, dem eine bestimmte Menge IES zugesetzt worden war, ein größerer IES-Anteil wiedergefunden werden konnte, als beim Chromatographieren des gleichen Gemisches nach Druckfiltration und fraktionierter Ätherausschüttelung. Dennoch dürften die in Tabelle 3 für die einzelnen Indolderivate angegebenen Werte ein brauchbares Bild der in den verschiedenen Entwicklungsstadien vorhandenen relativen Mengen wiedergeben.

Die Mengen der ICS, IES und IPS nehmen in den Blättern mit dem Alter der Pflanzen deutlich zu; der IAN-Gehalt fällt allerdings nach einer Zunahme in den Stadien 1—3 in den alten Blättern (Stadium 4) wieder ab. Zu ähnlichen Ergebnissen ist beim Weißkohl auch Melchior (1958) gekommen. Fischer (1954) hat auf eine Zunahme des IAN und der Zone „K" während der Entwicklung von Weißkohl hingewiesen. Schließlich haben auch Linser, Kiermayer und Youssef (1958) und Linser, Youssef und Kiermayer (1958) mit Hilfe eines *Avena*-Koleoptiltests (Pastentest) Angaben über den Gehalt an wuchsstoffwirksamer Substanz (IAN und IES) mitgeteilt. Aus ihrer Abb. 2 (Linser, Youssef und Kiermayer 1958) geht hervor, daß der Gehalt an Wuchsstoffen während der Entwicklung von Wirsingkohl und Blumenkohl zunächst ansteigt, nachher aber wieder abfällt. Da Linser et al. nur Werte für die IES und das IAN gemeinsam angeben, sind direkte Vergleiche mit meinen Ergebnissen nicht möglich, weil mir genaue Werte für das IAN nicht zur Verfügung stehen.

Der Wuchsstoffgehalt der Jungpflanzen des Blumenkohls beträgt bei Linser et al. das 8- bzw. 13fache des Gehalts bei Rosen. Die hohe Wuchsstoffaktivität wird von den Autoren im wesentlichen auf die Wirkung des IAN zurückgeführt. In meinen Versuchen erreichte die IAN-Menge in den Jugendstadien nie derartig hohe Werte; und diese

liegen außerdem nie über den in den Blumenkohlrosen nachgewiesenen Mengen. Im Bereich der größten Wuchsstoffaktivität zwischen den $R_f$-Werten 0,7 und 0,9 (LINSER, KIERMAYER und YOUSSEF 1958) finden sich nun aber nach meinen Untersuchungen mindestens 4—5 mit Indolreagentien färbbare Zonen. Außer dem IAN kommt hier beispielsweise der IA vor, der als Wachstumshemmstoff bekannt ist (MEYER 1958). Über die Wuchsstoffwirksamkeit der anderen noch unbekannten Stoffe liegen bisher noch keine Untersuchungen vor; bei der einen oder anderen Zone wäre daher eine Wuchsstoffwirksamkeit nicht ausgeschlossen. Vielleicht ist die ungewöhnlich große Wachstumsaktivität dieses gesamten $R_f$-Bereiches auf einen noch unbekannten Wuchsstoff zurückzuführen. LINSER, MAYR und MASCHEK (1954) haben z. B. auf einen in Extrakten aus Wirsingkohl, Weißkohl und Sprossenkohl im Bereich der IAN-Zone vorkommenden Wuchsstoff ohne Indolcharakter hingewiesen. Auch BENTLEY (1958) hat — gestützt auf Befunde von BENTLEY, HOUSLEY und BRITTON (1956) und BRITTON, HOUSLEY und BENTLEY (1956) — darüber berichtet, daß im Bereich der IAN-Zone Wuchsstoffwirkungen auftreten können, ohne daß Farbreaktionen feststellbar sind. ("It is noteworthy that high activity can sometimes accur in the nitrile zone, although no colour reactions can be obtained, even with heavily-loaded chromatograms. Activity in this region may be due to other unidentified substances".)

Die Blumenkohlrosen haben nach meinen Befunden einen bedeutend höheren Gehalt an Indolverbindungen als die Blätter (Tabelle 3 für die ICS, die IES und die IPS). Auch die übrigen Zonen sind beim visuellen Vergleich der Chromatogramme von Blumenkohlrosen mit denjenigen von Blattextrakten stärker. Hier liegt durchaus eine relative Übereinstimmung mit den Befunden von LINSER, YOUSSEF und KIERMAYER (1958) vor, wenn auch die Absolutangaben bei LINSER et al. weit über meinen Werten liegen. Eine Erklärung hierfür dürfte in der Verschiedenheit der Bestimmungsmethoden zu suchen sein, vor allen Dingen aber darin, daß es sich bei meinen Werten ja nicht um die Gesamtmenge an wuchsstoffaktiver Substanz, sondern lediglich um die ICS und ihre beiden höheren Homologen handelt.

## Zusammenfassung

Aus Blumenkohl (*Brassica oleracea* var. *botrytis L.*) wurden die darin enthaltenen Indolverbindungen nach vier verschiedenen Methoden extrahiert.

Nach der papierchromatographischen und papierelektrophoretischen Aufgliederung der Extrakte aus Blumenkohlrosengewebe konnten insgesamt 13 mit Sprühreagentien färbbare Zonen nachgewiesen werden,

bei denen es sich zum größten Teil um Indolderivate handeln dürfte. Hiervon wurden Tryptophan, β-Indolylcarbonsäure, β-Indolylessigsäure, β-Indolylpropionsäure, β-Indolylaldehyd und β-Indolylacetonitril identifiziert.

In den Blättern des Blumenkohls kommen im wesentlichen die gleichen Indolverbindungen wie in den Blumenkohlrosen vor.

Die in den verschiedenen Entwicklungsstadien und Pflanzenteilen des Blumenkohls vorliegenden Mengen an β-Indolylcarboxylsäure, β-Indolylessigsäure und β-Indolylpropionsäure wurden quantitativ bestimmt und untereinander verglichen; die Menge des jeweils vorhandenen β-Indolylacetonitrils konnte aus methodischen Gründen nur relativ bestimmt werden.

Bei der quantitativen Bestimmung konnte — bezogen auf das Frischgewicht — in den Blättern im Laufe der Ontogenie eine Zunahme im Gehalt an β-Indolylcarboxylsäure, β-Indolylessigsäure und β-Indolylpropionsäure festgestellt werden. Beim β-Indolylacetonitril-Gehalt der Blätter zeigte sich gleichfalls eine Zunahme während der Entwicklung; ausgewachsene Blätter von Pflanzen mit Rosen (Tabelle 3, Stadium 4) wiesen aber einen geringeren Gehalt an β-Indolylacetonitril auf als die Blätter jüngerer Pflanzen (Stadium 1—3).

Der Gehalt an β-Indolylcarboxylsäure, β-Indolylessigsäure, β-Indolylpropionsäure und β-Indolylacetonitril ist im Gewebe von Blumenkohlrosen wesentlich höher als in den anderen extrahierten Pflanzenteilen (Blätter, Blütensprosse und Blüten, unreife Früchte).

## Literatur


Armstrong, M. D., K. N. F. Shaw, M. J. Gortatowski and H. Singer: The indole acids of human urine. Paper chromatography of indole acids. J. biol. Chem. **232**, 17—30 (1958).

Bentley, J. A.: The naturally-occurring auxins and inhibitors. Ann. Rev. Plant Physiol. **9**, 47—80 (1958).

— K. R. Farrar, S. Housley, G. F. Smith and W. C. Taylor: Some chemical and physiological properties of 3-indolylpyruvic acid. Biochemic. J. **64**, 44—49 (1956).

— S. Housley and G. Britton: Hormones and hormon precursors in leaves, roots and seeds. In: The chemistry and mode of action of plant growth substances, R. L. Wain and F. Wightman, eds., p. 40—51. London: Butterworth Scientific Publ. 1956.

Bonde, E. K.: Auxin and auxin precursors in acid and nonacidic fractions of plant extracts. Bot. Gaz. **115**, 1—15 (1953).

Britton, G., S. Housley and J. A. Bentley: Studies in plant growth hormones. V. Chromatography of hormones in excised and intact roots of tomato seedlings. J. exp. Bot. **7**, 239—251 (1956).

DENFFER, D. v., M. BEHRENS u. A. FISCHER: Papierelektrophoretische Trennung von Indolderivaten aus Pflanzengeweben. Naturwissenschaften **39**, 258—259 (1952).

— — — Papierchromatographischer und papierelektrophoretischer Nachweis des $\beta$-Indolylacetonitrils und des $\beta$-Indolyladlehyds in Extrakten aus Kohlpflanzen. Naturwissenschaften **39**, 550—551 (1952).

FISCHER, A.: Über die papierchromatographische und papierelektrophoretische Trennung von Indolderivaten. Planta (Berl.) **43**, 288—314 (1954).

GORDON, S. A.: Occurrence, formation and inactivation of auxins. Ann. Rev. Plant Physiol. **5**, 341—378 (1954).

JONES, E. R. H., and W. C. TAYLOR: Some indole constituents of cabbage. Nature (Lond.) **179**, 1138 (1957).

KEFFORD, N. P.: The growth substances separated from plant extracts by chromatography. J. exp. Bot. **6**, 129—151 (1955).

LINSER, H.: Zur Methodik der Wuchsstoffbestimmung. II. Die Extraktion von Pflanzenmaterial. Planta (Berl.) **29**, 392—408 (1939).

— Über das Vorkommen von Hemmstoff in Pflanzenextrakten, sowie über das Verhältnis von Wuchsstoffgehalt und Wuchsstoffabgabe bei Pflanzen oder Pflanzenteilen. Planta (Berl.) **31**, 32—59 (1940).

— Versuche zur chromatographischen Trennung von Wuchs- und Hemmstoffen. Planta (Berl.) **39**, 377—401 (1951).

— H. MAYR u. F. MASCHEK: Papierchromatographie von zellstreckend wirksamen Indolkörpern aus Brassica-Arten. Planta (Berl.) **44**, 103—120 (1954).

— O. KIERMAYER u. E. YOUSSEF: Der Wuchsstoffgehalt verschiedener Brassica-Pflanzen in Abhängigkeit von ihrem Entwicklungszustand. Planta (Berl.) **52**, 173—186 (1958).

— E. YOUSSEF u. O. KIERMAYER: Hohe Gehalte an Indolderivaten bei Brassica-Gemüsen. Z. Lebensmitt.-Untersuch. **108**, 358—362 (1958).

MELCHIOR, G. H.: Über den Abbau von Indolderivaten. I. Photolyse durch ultraviolettes Licht. Planta (Berl.) **50**, 265—290 (1957).

— Über den Abbau von Indolderivaten. II. Abbau durch ein Enzymsystem aus Weißkohl und ein Vergleich der Indolderivate in UV-bestrahlten und unbestrahlten Weißkohlpflanzen. Planta (Berl.) **50**, 557—575 (1958).

MEYER, J.: Die photolytischen Abbauprodukte der 3-Indolessigsäure und ihre physiologische Wirkung auf das Wachstum der Avena-Koleoptile. Z. Bot. **46**, 125—160 (1958).

NITSCH, J. P., and C. NITSCH: The separation of natural plant growth substances by paper chromatography. Beitr. Biol. Pflanz. **31**, 387—408 (1955).

OVERBEEK, J. VAN, G. DAVILA OLIVO and E. S. DE VAZQUEZ: A rapid extraction method for free auxin and its application in geotropic reactions of bran seedlings and sugar cane nodes. Bot. Gaz. **106**, 440—451 (1945).

— E. S. DE VAZQUEZ and S. A. GORDON: Free and bound auxin in the vegetative pineapple plant. Amer. J. Bot. **34**, 266—270 (1947).

SCHNEIDER, G., u. G. SPARMANN: Über ein Verfahren zur Durchführung der Papier-Hochspannungselektrophorese ohne Kühlung. Naturwissenschaften **42**, 156 (1955).

SEN, S. P.: Wachstumsregulatoren und verwandte Stoffe. In: H. F. LINSKENS Papierchromatographie in der Botanik, 2. Aufl., S. 248—281. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959.

— and A. C. LEOPOLD: Paper chromatography of plant growth regulators and allied compounds. Physiol. Plantarum (Cph.) **7**, 98—108 (1954).

Siegel, S. M., and A. W. Galston: Experimental coupling of indoleacetic acid to pea root protein in vivo and in vitro. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **39**, 1111—1118 (1953).

Sparmann, G., u. G. Schneider: Die Anwendung der Ultrafiltration zur Fraktionierung von Pflanzenpreßsäften und -extrakten. Naturwissenschaften **42**, 298 (1955).

Udenfriend, S.: J. biol. Chem. **215**, 337 (1955). Ref. bei K. Schreier u. K. Gaedtke, Über die Papierchromatographische Bestimmung von Serotonin und anderen Indolkörpern. Naturwissenschaften **43**, 130 (1956).

Weller, L. E., S. H. Wittwer and H. M. Sell: The detection of 3-indole-acetic acid in cauliflower heads. Chromatographic behavior of some indole compounds. J. Amer. chem. Soc. **76**, 629—630 (1954).

Wildman, S. G., and R. M. Muir: Observations of the mechanism of auxin formation in plant tissues. Plant Physiol. **24**, 84—92 (1949).

Dr. Franz Müller,
Institut für landwirtschaftliche Botanik, Bonn a. Rh.,
Meckenheimer Allee 176

Planta 57, 478—480 (1961)

## Kurze Mitteilung

Aus der Biologischen Forschungsabteilung
der Österreichischen Stickstoffwerke Aktiengesellschaft, Linz a. d. Donau

# ZUM NACHWEIS VON CHLORCHOLINCHLORID IN PFLANZEN

Von

H. H. Mayr und E. Presoly

*(Eingegangen am 8. August 1961)*

Neuerdings wurde das Interesse wieder auf die pflanzenphysiologischen Wirkungen von Chlorcholinchlorid (CCC) gelenkt (Tolbert 1960a und b; Wittwer und Tolbert 1960; Linser, Mayr und Bodo 1961).

Nach Behandlung mit CCC und ähnlichen Verbindungen in kleinsten Mengen entwickeln sich gedrungene Pflanzen mit kürzerem und dickerem Stamm als bei den Kontrollen. Die Wirkung dieser Verbindungen auf das Pflanzenwachstum scheint antagonistisch zu der der Gibberelline zu sein.

Mit dem Ziele des chemischen Nachweises von CCC in behandeltem Pflanzenmaterial wurden von uns einige Methoden untersucht, über die hier kurz berichtet werden soll. Die absteigende Papierchromatographie ergab mit Papier Whatman I, dem Lösungsmittel Isopropanol, Ammoniak (d = 0,91), Wasser (80:5:15) bei einer Laufzeit von 16 Std für CCC einen $R_f$-Wert von 0,5. Betain hat einen anderen $R_f$-Wert (0,32) und gibt mit dem nachstehend beschriebenen Reagens einen anderen Farbspot (gelborange). Zum Nachweis wurde ein modifiziertes Dragendorffsches Reagens (Werle 1955) verwendet:

a) 2,5 g Wismutnitrat in 20 ml Wasser gelöst + 5 ml konz. HCl = Lösung I.

b) 3,4 g KJ in 10 ml Wasser gelöst + 5 ml Eisessig = Lösung II. Die beiden Lösungen werden vereinigt, filtriert und ergeben die Stammlösung. Bei Gebrauch werden 5 ml Stammlösung mit 10 ml Eisessig versetzt und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. CCC am Papierchromatogramm besprüht, liefert einen roten Spot auf gelbem Hintergrund; es können Mengen bis zu 2,5 $\gamma$ nachgewiesen werden.

Gute Ergebnisse erzielten wir auch papierelektrophoretisch mit der Apparatur Elphor H. Bei Verwendung eines Phosphatpuffers von $p_H$ 6, Papier Schleicher & Schüll 2045b, einer Laufzeit von 30 min bei einer Spannung von 700 V, 5—7 mA und Besprühen des getrockneten Streifens mit dem oben beschriebenen Reagens, war CCC etwa 7 cm von der Startlinie in der Richtung zur Kathode gewandert.

Etwas größere CCC-Mengen lassen sich mit Hilfe der kontinuierlichen Papierelektrophorese in Elphor V abtrennen. Unter unseren Bedingun-

gen (Phosphatpuffer, $p_H$ 6, Papier Whatman 3, Laufzeit 5 Std, 200 V, 17 mA) war CCC in der Richtung zur Kathode gewandert und wurde im äußersten Röhrchen gefunden.

Zur Extraktion von CCC aus Pflanzenmaterial verfuhren wir wie folgt: 3 g junge Tomatenpflanzen (frisch), welche mit CCC behandelt waren, wurden mit 200 ml 70% Alkohol 2 Std extrahiert; der Extrakt wurde auf 10 ml eingeengt, mit 50 ml Wasser und wenig Tierkohle versetzt, 10 min geschüttelt, filtriert, mit 25 ml Wasser nachgewaschen, über Aluminiumoxyd filtriert, mit Alkohol nachgewaschen, eingedampft und mit 0,2 ml Wasser aufgenommen. Dieser Extrakt gelangte zur Chromatographie bzw. Elektrophorese. Fallweise machten Verunreinigungen trotzdem eine doppelte papierchromatographische Trennung notwendig. Eine Reinigung des Extraktes mit Hilfe von Ionenaustauschern ohne CCC-Verluste war uns bisher nicht möglich.

Während wir anfänglich bei den Versuchen ausschließlich mit jungen Tomatenpflanzen gearbeitet haben, dehnten wir unsere Untersuchungen später auf *ältere* Tomaten- und Weizenpflanzen aus. Außerdem erhöhten wir die Einwaagen für die Herstellung der Extrakte von 3 g auf 10 g. Chromatographierten wir diese Extrakte in der beschriebenen Weise, so erhielten wir nach Besprühen mit modifiziertem Dragendorffschen Reagens auch bei Kontrollpflanzen, welche nicht mit CCC behandelt waren, einen roten Spot mit einem $R_f$-Wert von 0,5, der nicht von dem durch CCC hervorgerufenen zu unterscheiden war. Pflanzen, die mit verschiedenen Konzentrationen von CCC behandelt waren, lieferten an derselben Stelle einen gleichen, entsprechend der angewandten CCC-Menge verstärkten bzw. vergrößerten Farbfleck am Chromatogrammpapier. Die Papierelektrophorese mit den Apparaturen Elphor H und V brachte vollkommen analoge Ergebnisse. Alle Versuche, insbesondere auch mit Ionentauschern, den natürlicherweise in älteren Pflanzen vorhandenen Stoff von dem nach CCC-Behandlung entstandenen oder auch von zugesetztem CCC zu trennen, waren bisher ohne Erfolg. Nachdem eine papierchromatographische und elektrophoretische Trennung nicht möglich war, und auch die Farbreaktion keine Unterscheidung von CCC möglich machte, liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei dem von uns in normalen (unbehandelten) Tomaten- und Weizenpflanzen gefundenen Stoff um eine strukturell sehr nahe verwandte Verbindung handelt. In Wiesengras konnten wir diesen Stoff nicht nachweisen.

## Zusammenfassung

Es wird über den papierchromatographischen und elektrophoretischen Nachweis von Chlorcholinchlorid (CCC) in Pflanzen berichtet. In Tomaten- und Weizenpflanzen wurde eine natürlicherweise vorkommende Substanz gefunden, welche sich mit den oben beschriebenen Analysenverfahren nicht von Chlorcholinchlorid unterscheiden läßt.

## Literatur

Linser, H., H. H. Mayr u. G. Bodo: Über die Wirkung von Chlorcholinchlorid auf Sommerweizen. Bodenkultur (1961, im Druck.)

Tolbert, N. E.: (2-Chloroethyl)trimethylammonium chloride and related compounds as plant growth substances. I. Chemical structure and bioassay. J. biol. Chem. **235**, 475—479 (1960a).

— (2-Chloroethyl)trimethylammonium chloride and related compounds as plant growth substances. II. Effect on growth of wheat. Plant Physiol. **35**, 380—385 (1960b).

Werle, E.: In K. Paech u. M. V. Tracey, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. IV. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.

Wittwer, S. H., and N. E. Tolbert: (2-Chloroethyl)trimethylammonium chloride and related compounds as plant growth substances. III. Effect on growth and flowering of the tomato. Amer. J. Bot. **47**, 560—565 (1960).

Dr. H. H. Mayr und E. Presoly,
Biologische Forschungsabteilung der Österreichischen Stickstoffwerke AG
Linz 2, Haag 19, Österreich

# Aufnahmebedingungen

## *I. Sachliche Anforderungen*

Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigung bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Vorläufige Mitteilungen werden nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellungen der Tatbestände ist zulässig.

## *II. Formelle Anforderungen*

Originalarbeiten sollen nicht umfangreicher als zwei Druckbogen (à 16 Druckseiten) sein; Kurze Mitteilungen dürfen den Umfang von vier Druckseiten nicht überschreiten.

Das Manuskript muß leicht leserlich und einseitig geschrieben sein. Die Abbildungs-Vorlagen sind auf besonderen Blättern einzureichen, ebenso die Legenden. Die Arbeiten müssen knapp und sprachlich klar geschrieben sein. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. *Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen* (in Monographien, „Ergebnissen", Handbüchern) *herzustellen.*

Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.

Für die Rechtschreibung ist die „wissenschaftliche Rechtschreibung nach JANSEN" maßgebend, mit der die Schreibung der Termini im „Handwörterbuch der Naturwissenschaften" (Jena 1931—1934) im wesentlichen übereinstimmt.

Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse anzufügen. Eine Übersetzung dieser Zusammenfassung in eine andere der Kongreß-Sprachen kann in Petit-Druck hinzugefügt werden, sofern beide Zusammenfassungen nicht mehr als insgesamt $1^1/_2$ Druckseiten beanspruchen.

Von jeder Versuchsart bzw. von jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text, oder wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber zu umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. Es wird empfohlen durch eine Fußnote darauf hinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen und angefordert werden kann.

Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige zu beschränken. Knappe Abbildungsunterschriften erübrigen nochmalige Beschreibung im Text. Unzulässig ist die doppelte Darstellung in Tabelle *und* Kurve. Für Halbtonbilder (Photos, Mikrophotos, Halbtonzeichnungen) sind reproduktionsfähige, d.h. scharfe, gut durchgezeichnete und tonwertreiche Vorlagen (Hochglanzabzüge) einzureichen. Die Beschriftung der Abbildungen mit Buchstaben und/oder Ziffern erfolgt durch den Verlag. Die Hinweise sind auf einem über die Vorlage geklebten Deckblatt einzureichen. Für schematische Schwarzweißzeichnungen, die als Strichätzungen reproduziert werden sollen, sind saubere, klare Skizzen abzuliefern, die vom Verlag umgezeichnet werden.

*Literaturangaben*, die nur im Text berücksichtigte Arbeiten enthalten dürfen, erfolgen mit vollständigem Titel der Arbeit, Zeitschriftentitel (in der Abkürzung nach den World Medical Periodicals), Band-, Seiten- und Jahreszahl. Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen (jeweils mit Anfangsbuchstaben des Vornamens) *alphabetisch* anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der betreffenden Stelle im Text eine in Klammer gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literaturverzeichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem Titel, Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.

Die Beschreibung von Methodik, Protokollen und weniger wichtigen Teilen ist für Kleindruck vorzumerken. Autorennamen sollen (für KAPITÄLCHEN-Druck) doppelt, lateinische Namen der Objekte (für *Kursiv*-Druck) geschlängelt unterstrichen werden. In Kursiv-Druck können auch andere Worte des Textes gesetzt werden, die der Autor besonders hervorzuheben wünscht.

Das Zerlegen der Arbeit in mehrere Mitteilungen, um sie kürzer erscheinen zu lassen, ist unzulässig.

Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel nicht die gleichen sind.

Danksagungen können in Form von Fußnoten zum Beitragstitel oder als kurzer Petitabschnitt am Schluß der Arbeit gebracht werden. *Festschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.

In der Korrektur sollen nur Druckfehler verbessert, jedoch keine inhaltlichen oder stilistischen Änderungen vorgenommen werden. 10% der Satzkosten übersteigende Korrekturkosten müssen den Autoren in Rechnung gestellt werden.

Handbuch der Pflanzenphysiologie

Encyclopedia of Plant Physiology

Herausgegeben von W. RUHLAND †

In Gemeinschaft mit

E. ASHBY, Belfast · J. BONNER, Pasadena · M. GEIGER-HUBER, Basel · W. O. JAMES, London · A. LANG, Pasadena · D. MÜLLER, Kopenhagen · M. G. STÅLFELT, Stockholm

In 18 Bänden

*Vor kurzem erschien:*

16. Band

## Außenfaktoren in Wachstum und Entwicklung
## External Factors Affecting Growth and Development

Redigiert von G. MELCHERS, Tübingen

Mit 201 Abbildungen und 1 Porträt. XXVI, 950 Seiten Gr.-8°. 1961.

(11 Beiträge in englischer und 7 Beiträge in deutscher Sprache)

Ganzleinen DM 268,—

Bei Verpflichtung zur Abnahme des Gesamtwerkes Subskriptionspreis Ganzleinen DM 214,40; jedoch ist jeder Band zum Ladenpreis einzeln käuflich

INHALTSÜBERSICHT

Einführung. Von G. MELCHERS, Tübingen · Temperatur: Survey; Thermoperiodicity. By F. W. WENT, St. Louis/Missouri, USA. Kältebedürfnis in Wachstum und Entwicklung · Strahlungen: Licht einschließlich langwelliges Rot. The effects of ultraviolet radiation on plants. By J. A. LOCKHART, Pasadena/Cal., USA, and U. BRODFÜHRER-FRANZGROTE, Gauting b. München. Ionizing radiations. By J. E. GUNCKEL, New Brunswick/N.J., USA, and A. H. SPARROW, Upton/L.I., N.Y., USA. Meterwellen. Von J. REINERT, Tübingen · The effect of water supply and humidity on growth and development. By E. WANGERMANN, Leicester, Great Britain · Die mechanischen Wirkungen auf das Pflanzenwachstum. Von F. GESSNER, München · Hydrostatischer Druck und Pflanzenwachstum. Von F. GESSNER, München · Chemische Einflüsse von außen: Chemical influences of other plants (allelopathy). By M. EVENARI, Jerusalem, Israel. Chemical influences of the environment. By D. J. CARR, Belfast, Northern Ireland · Namenverzeichnis Author Index · Sachverzeichnis (Deutsch-Englisch); Subject Index (English-German).

**SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG**



Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg. — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg
Printed in Germany